

Р. Стейниер
Э. Эдельберг
Дж. Ингрэм

МИР МИКРОБОВ

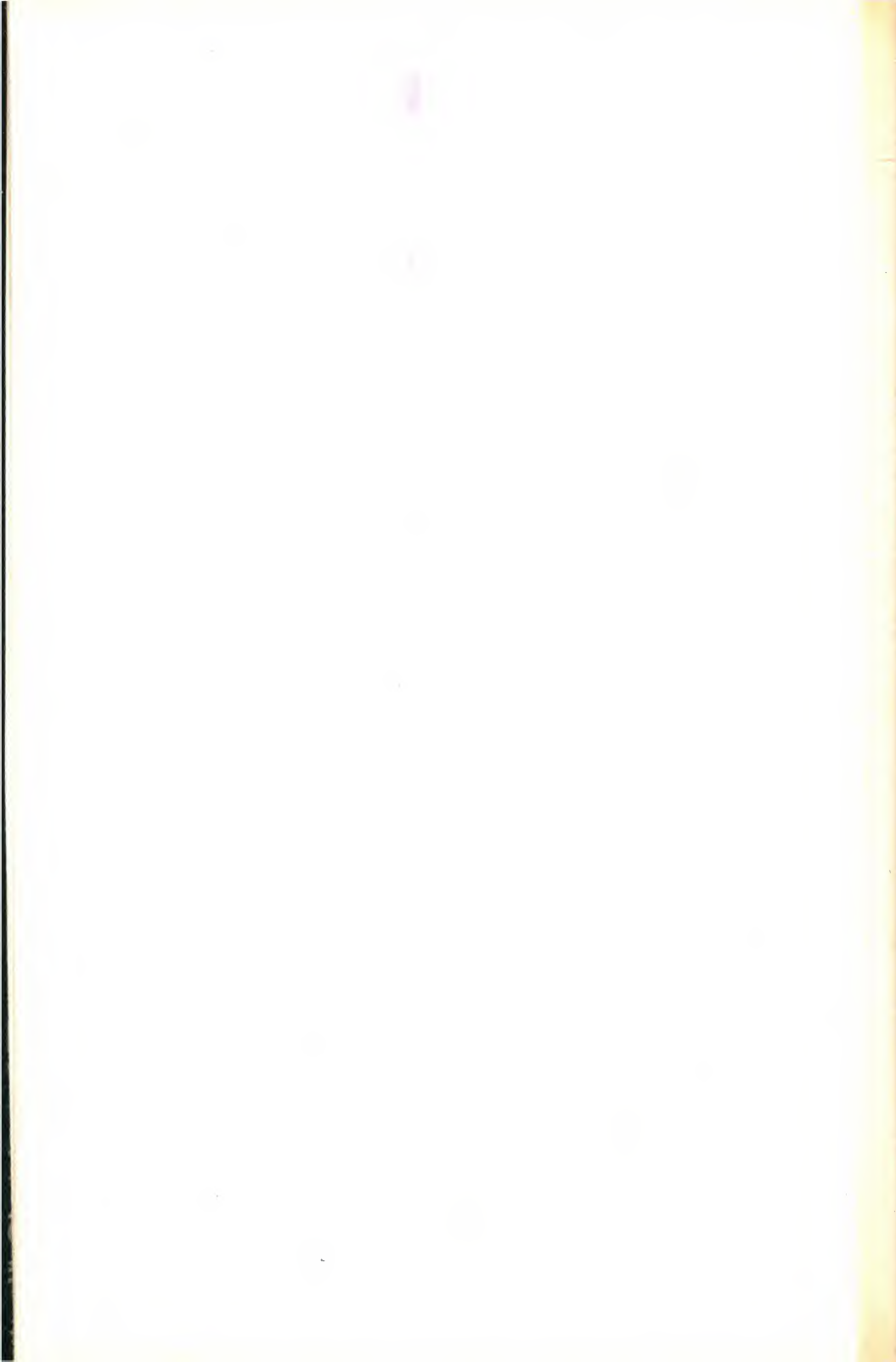
1

ТОМ

Издательство
"Мир"
Москва









The Microbial World

Fourth edition

ROGER Y. STANIER
Institut Pasteur
Paris 15^e, France

EDWARD A. ADELBERG
Yale University School
of Medicine New Haven,
Connecticut, 06510

JOHN L. INGRAHAM
University of California
Davis, California, 95616

Prentice-Hall, Inc.,
Englewood Cliffs, New Jersey

Р. Стейниер
Э. Эдельберг
Дж. Ингрэм

МИР МИКРОБОВ

1
ТОМ

Перевод с английского
под редакцией
д-ра биол. наук
Е. Н. КОНДРАТЬЕВОЙ
и
д-ра биол. наук
С. В. ШЕСТАКОВА

Издательство
»Мир«
Москва
1979

Книга известных микробиологов — Р. Стейниера, Э. Эдельберга и Дж. Ингрэма — выдержала четыре издания и переведена на французский, испанский, итальянский и японский языки. Авторам удалось дать четкую картину мира микробов во всем его многообразии и взаимоотношениях с другими живыми существами; при этом широко используются достижения биохимии, молекулярной биологии, генетики и вирусологии.

В русском переводе книга издается в трех томах. Первый том содержит исторический очерк развития науки о микроорганизмах, описание методов микробиологии, строения клетки у бактерий и простейших, энергетического обмена и процессов биосинтеза у микроорганизмов.

Книга предназначена для микробиологов, вирусологов, биохимиков, генетиков, молекулярных биологов, врачей, для преподавателей, аспирантов и студентов университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

Редакция литературы по биологии

2605030000

С $\frac{21007-384}{041(01)-79}$ -79

© 1976, 1970, 1963, 1957 by Prentice-Hall, Inc.,
Englewood Cliffs, New Jersey

© Перевод на русский язык, «Мир», 1979

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ ПЕРЕВОДА

Книга «Мир микробов» пользуется за рубежом широкой известностью. Это превосходное руководство по общей микробиологии имеет большее значение, чем обычный учебник. Знакомство с ним важно для биологов самого разного профиля.

Неизменными авторами «Мира микробов» до последнего, четвертого издания были такие видные ученые, как Р. Стейниер, Э. Эдельберг и М. Дудоров, которых объединяла первоначально общая работа в Калифорнийском университете. После кончины М. Дудорова его заменил как один из авторов профессор Дж. Ингрэм.

В самом названии книги подчеркнуто стремление рассмотреть микроорганизмы во всем их удивительном разнообразии. Действительно, из 31 главы книги 12 посвящены описанию особенностей разных микроорганизмов. Обсуждается также их положение среди других организмов и принципы классификации.

Однако это сделано не в ущерб другим проблемам микробиологии. Достаточно подробно изложены основные методы, применяемые при изучении микроорганизмов, а именно: методы получения чистых культур, их выращивания и микроскопирования. Сопоставляются строение и химический состав эукариот, прокариот и вирусов. Обсуждается зависимость роста микроорганизмов от различных факторов среды. Изложены биохимические основы процессов энергетического и конструктивного метаболизма. Значительное внимание уделено фундаментальным вопросам молекулярной биологии и генетики микроорганизмов с привлечением новейшего материала. Нашли отражение и новые сведения о механизмах транспорта веществ, в изучении которых на микроорганизмах в последнее время достигнуты значительные успехи.

Наряду с этим в книге содержатся сведения об экологии микроорганизмов и масштабах их геохимической деятельности. Прекрасно изложен материал о разных формах симбиотических взаимоотношений, в которые вступают микроорганизмы. Эта область чрезвычайно интересна и в последние годы привлекает особенно большое внимание исследователей. Наконец, имеется глава, обобщающая в краткой форме основные достижения в области практического использования микроорганизмов для получения различных продуктов в промышленных масштабах.

Большой и нередко сложный материал изложен просто, логично и с глубоким анализом. Он иллюстрирован нагляд-

ными таблицами и рисунками, имеющими немалое информационное значение.

Выход в свет «Мира микробов» на русском языке является весьма важным пополнением той микробиологической литературы, которая необходима студентам, аспирантам, а также преподавателям, научным и практическим работникам, деятельность которых связана с изучением и использованием микроорганизмов.

Книга не только позволяет получить основные знания о мире микробов; она показывает и заставляет задуматься над тем, как много дало исследование микроорганизмов для развития ряда областей современной биологии, какие огромные возможности открывает их дальнейшее изучение.

*Е. Н. Кондратьева
С. В. Шестаков*

ПРЕДИСЛОВИЕ К ЧЕТВЕРТОМУ ИЗДАНИЮ

Четвертое издание этой книги посвящается памяти нашего друга и коллеги М. Дудорова, одного из первоначальных авторов «Мира микробов». Вся его деятельность прошла в Калифорнийском университете в Беркли. Он был ведущим среди тех, кто в течение десятилетий, прошедших после второй мировой войны, превратил Беркли в крупный центр исследований в области биохимии и физиологии микроорганизмов. Он начал работать на кафедре бактериологии в 1940 г., организовал и возглавил всю программу обучения общей микробиологии и один нес ответственность за этот курс, пока через несколько лет на кафедре не появились двое из нас (Р. Стейниер и Э. Эдельберг). «Мир микробов», впервые опубликованный в 1957 г., вырос из вводного курса лекций, который мы тогда все вместе читали в Беркли. Эти лекции были целиком спланированы М. Дудоровым; потому он и является истинным основателем «Мира микробов».

Когда готовилось первое издание этой книги, микробиология все еще была почти полностью оторвана от остальной биологической науки. Но так как было уже очевидно, что период ее изоляции подходит к концу, мы в 1957 г. поставили своей целью изложить наш материал в контексте общебиологических концепций. К тому времени в микробиологии уже начал накапливаться тот экспериментальный материал, который позднее привел к открытию молекулярных основ биологических функций, хотя молекулярно-биологический переворот еще был впереди. Теперь, спустя почти 20 лет, интеллектуальный климат в биологии в целом и в микробиологии в частности стал совершенно иным. По мере того как он менялся, нам приходилось при подготовке последующих изданий «Мира микробов» каждый раз пересматривать объем и характер включаемого материала и коренным образом менять структуру книги. Настоящее издание переработано значительно меньше, чем все предыдущие. Сохранены общий план и содержание третьего издания, хотя большая часть глав была целиком переписана заново. Как всегда, мы будем приветствовать замечания и критику читателей.

Мы хотели бы выразить благодарность всем, кто помогал нам в подготовке этого издания. Мы признательны многочисленным коллегам, которые откликнулись на наши просьбы о предоставлении нового иллюстративного материала. Д-р Марк Уилис прочел всю рукопись и сделал много конструктивных замечаний относительно ее стиля и содержания. Марджори Ингрэм оказала нам неоценимую помощь в перепечатке рукописи и чтении корректур.

*Р. Стейниер
Э. Эдельберг
Д. Ингрэм*

ПЕРВЫЕ ШАГИ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология — это наука о таких организмах, которые слишком малы, чтобы их можно было хорошо разглядеть невооруженным глазом, и потому были названы микроорганизмами. Если величина объекта менее 0,1 мм, наш глаз вообще не сможет его увидеть, а у объекта диаметром 1 мм можно различить лишь немногие детали. Поэтому микроорганизмами являются такие организмы, диаметр которых не превышает примерно 1 мм; их изучение и составляет задачу микробиологической науки. В таксономическом отношении микроорганизмы весьма разнообразны. К ним относятся некоторые многоклеточные животные, простейшие, многие водоросли и грибы, бактерии и вирусы. Существование мира микробов оставалось неизвестным, пока не появились микроскопы. Изобретенный в начале XVII в. микроскоп открыл для систематического научного исследования целое царство мельчайших организмов.

Первые микроскопы были двух типов. *Простые* микроскопы имели одну линзу с очень коротким фокусным расстоянием, которая поэтому могла давать большое увеличение. По своему оптическому принципу такие микроскопы ничем не отличаются от обычных увеличительных стекол, которые способны увеличивать изображение в несколько раз и были известны еще с античных времен. Другой тип составляли *сложные* микроскопы с двумя линзами или системами линз — объективом и окуляром. Такой микроскоп способен давать большое увеличение, и постепенно он полностью вытеснил простые линзы. Все наши современные микроскопы являются сложными. Однако почти все первые великие открытия в области невидимого ранее мира были сделаны с помощью простых микроскопов.

ОТКРЫТИЕ

МИРА МИКРОБОВ

Мир микробов открыл голландский коммерсант Антони ван Левенгук (рис. 1.1). Он совмещал свою научную деятельность с жизнью, заполненной торговыми делами и гражданскими обязанностями. В его время это не было чем-то необычным. В тот период великие открытия во всех областях науки делались любителями, которые зарабатывали на жизнь другими способами или же были достаточно богаты и не нуждались в заработке. Левенгук, однако, отличался от современных ему ученых в одном отношении: он получил лишь



Рис. 1.1. Антони ван Левенгук (1632—1723). На этом портрете он изображен с одним из своих микроскопов. (Любезно предоставлено Государственным музеем в Амстердаме.)

небольшое образование и никогда не посещал университета. Это, вероятно, не мешало его научным успехам, так как доступное в то время образование мало что могло дать для дела всей его жизни. Когда появились сообщения о его открытиях, гораздо более серьезной помехой было отсутствие у него связей с ученым миром и то, что он владел лишь голландским языком. Тем не менее обстоятельства сложились так счастливо, что труды Левенгука получили широкую известность еще при его жизни, и их значение было сразу же понято. Приблизительно в то время, когда Левенгук начал проводить свои наблюдения, в Англии было создано Королевское общество, в задачи которого входили организация докладов о научных работах и их публикация. Это общество пригласило Левенгука сделать сообщение о сделанных им наблюдениях, а через несколько лет (в 1680 г.) избрало его своим членом. В течение почти 50 лет, вплоть до своей смерти в 1723 г., Левенгук сообщал о своих открытиях, посылая Королевскому обществу длинные серии писем на голландском языке. Большая часть этих писем была переведена на английский язык и опубликована в трудах Общества (*Proceedings of the Royal Society*); таким образом, они быстро становились широко известными.

Микроскопы Левенгука (рис. 1.2) были мало похожи на те инструменты, к которым мы привыкли. Короткофокусная линза (а) почти сферической формы была закреплена между двумя небольшими металлическими пластинами. Исследуемый объект располагался на кончике короткой толстой иглы (б), прикрепленной к задней пластине, и его приводили в фокус вращением двух винтов (в и г), изменявших положение иглы относительно линзы. Во время этой операции наблюдатель приближал прибор другой стороной к глазу и через линзу разглядывал объект. Увеличение изменять было нельзя — оно у каждого микроскопа определялось свойствами использованной линзы. Несмотря на простоту конструкции, микроскопы Левенгука давали хорошее изображение при увеличениях примерно от 50 до 300, в зависимости от фо-

кусного расстояния линзы. Таким образом, наибольшее увеличение, которого смог достичь Левенгук, составляет несколько меньше трети максимального увеличения, которое можно получить с помощью современного сложного светового микроскопа. Левенгук построил сотни таких приборов, и некоторые из них сохранились до наших дней.

Место, которое занимает Левенгук в истории науки, определяется не столько его умением изготавливать микроскопы (хотя и оно сыграло существенную роль), сколько необычайной широтой и мастерством проведенных им микроскопиче-

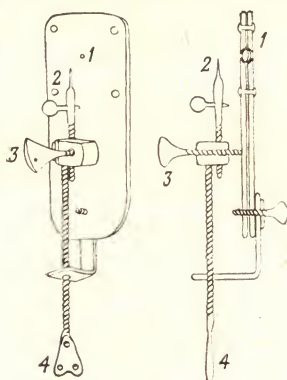


Рис. 1.2. Устройство одного из микроскопов Левенгука. 1 — линза; 2 — булавка, к которой крепится объект; 3 и 4 — фокусирующие винты. (По Dobell C. E., Antony van Leeuwenhoek and his little animals. New York, Russel and Russel, Inc., 1932.)

ских наблюдений. Он был необычайно любознателен и исследовал чуть ли не все, на что можно было посмотреть в микроскоп. Им проведены изумительные наблюдения микроскопической структуры семян и зародышей растений, мелких беспозвоночных животных. Левенгук открыл существование сперматозоидов и красных кровяных телец и таким образом положил начало изучению гистологии животных. Открыв и описав капилляры, он завершил исследование кровообращения, которое за полвека до него начал Гарвей. Легко можно было бы заполнить целую страницу, только перечисляя важнейшие открытия Левенгука, касающиеся микроструктуры высших растений и животных. Однако в основном он прославился тем, что открыл микробов — целый мир микроскопических «животных», или «animalcules», как называли их Левенгук и его современники. Это существенно расширило горизонты биологии. Левенгуком были впервые описаны представители всех основных групп одноклеточных организмов, известных нам сейчас, — простейшие, водоросли, дрожжи и бактерии, причем зачастую настолько точно, что по его описаниям можно распознать отдельные виды. Левенгук выявил не только разнообразие микробов, но и их невероятное изобилие. Например, в одном письме, в котором впервые были описаны бактерии полости рта человека, он писал:

«В моем доме побывало несколько дам, которые с интересом разглядывали крошечных «червячков», живущих в уксусе; однако у некоторых это зрелище вызвало такое отвращение, что они поклялись никогда больше не пользоваться уксусом. Ну а если бы им сказали, что в соскобе с человеческого зуба подобных существ больше, чем людей в целом королевстве?»

Современники Левенгука были поражены его научными открытиями. Однако столь блестяще начатое им микроскопическое исследование мира микробов в течение целого века после его смерти не продвинулось сколько-нибудь заметно дальше. Такая длительная задержка была, по-видимому, обусловлена чисто техническими причинами. Пользоваться простыми микроскопами с большим увеличением было трудно и утомительно, а изготовление крошечных короткофокусных линз требовало высокого мастерства. Поэтому большинство современников Левенгука и его непосредственных преемников пользовались сложными микроскопами. И хотя сложные микроскопы в принципе лучше простых, у тех приборов, которые имелись в XVII и XVIII столетиях, были серьезные оптические недостатки, что делало их менее эффективными инструментами по сравнению с простыми микроскопами Левенгука. Поэтому, например, англичанин Роберт Гук, современник Левенгука, не смог, пользуясь своим сложным микроскопом, повторить многие из самых тонких наблюдений Левенгука, хотя и был весьма способным и внимательным исследователем.

В период примерно с 1820 по 1870 г. был осуществлен ряд усовершенствований, приведших в конце концов к созданию сложных микроскопов, по качеству близких к современному. Сразу же после введения этих усовершенствований возобновилось изучение мира микробов, и к концу XIX в. были уже детально исследованы основные группы микроскопических организмов. Тем временем, однако, микробиологическая наука развивалась и в других направлениях, что привело к открытию роли микробов в круговороте веществ и в возникновении болезней.

СПОР О САМОЗАРОЖДЕНИИ ОРГАНИЗМОВ

После того как Левенгук открыл, что в природе существует огромное множество микроскопических созданий, ученые стали интересоваться их происхождением. С самого начала было два направления. Некоторые были убеждены, что крохотные животные зарождаются спонтанно из неживой материи, тогда как другие (в том числе и Левенгук) полагали, что они образуются из «семян» или «зародышей», которые всегда имеются в воздухе. Учение о спонтанном возникновении жи-

вых существ из неживой материи известно как доктрина «самозарождения», или «абиогенеза», и имеет длительную историю. Во времена античности считалось очевидным, что многие растения и животные могут при определенных условиях зарождаться самопроизвольно. Вплоть до эпохи Возрождения доктрина спонтанного возникновения жизни принималась безоговорочно.

По мере накопления знаний о животных организмах становилось все яснее, что самозарождения растений и животных просто не бывает. Решающий поворот, приведший к отказу от этого учения в отношении животных, произошел в результате опытов, которые провел около 1665 г. итальянский врач Франческо Реди. Он показал, что черви, которые развиваются в гниющем мясе,— это на самом деле личинки мух и что они никогда не появляются, если поместить мясо в закрытый кисеей сосуд, чтобы мухи не смогли отложить на него яйца. Эти опыты Реди разрушили миф о самозарождении червей в мясе. Таким образом, к тому времени как Левенгук открыл мир микробов, учение о самозарождении было уже подорвано данными о развитии растений и животных. По чисто техническим причинам невозможность спонтанного зарождения микроорганизмов доказать гораздо труднее, и сторонники этого учения делали все больший упор на тот факт, что простейшие формы жизни таинственным образом появляются в органических настоях. Те, кто не верил в самозарождение микроорганизмов, находились в затруднительном положении, так как им требовалось доказать негативное положение — отсутствие спонтанного зарождения. Лишь к середине XIX в. накопилось уже так много отрицательных результатов, что это привело наконец к отказу от теории самозарождения.

Одним из первых, кто получил веские данные в пользу того, что микроорганизмы не возникают в органических настоях спонтанно, был итальянский натуралист Лаццаро Спалланцани. В середине XVIII в. он провел большую серию опытов, и ему неоднократно удавалось показать, что прогрев настоя препятствует появлению в нем крошечных существ, хотя длительность необходимого прогрева варьировала от опыта к опыту. Спалланцани сделал вывод, что «мельчайшие животные» могут попадать в настои из воздуха и что этим и объясняется их как будто бы спонтанное зарождение в хорошо прогретых настоях. До него другие исследователи закрывали сосуды с настоями пробкой, но Спалланцани не удовлетворился этим: считая, что никакая механическая затычка не может полностью исключить проникновение воздуха в сосуд, он стал их герметически запечатывать. Он обнаружил, что если сосуд запечатать, то настой в нем останется бесплодным долгое время, тогда как даже небольшая трещина в стекле приводит к быстрому развитию в нем мельчайших организ-

мов. В конце концов он сделал вывод, что если настой герметически закрыть в сосуде и прокипятить, то в нем никогда не возникнут живые существа. Они появятся там только после того, как в сосуд каким-то образом проникнет внешний воздух, который придет в соприкосновение с настоем.

Изысканные опыты Спалланцани продемонстрировали всю трудность такого рода работы. Однако продолжали ставиться ошибочные эксперименты, и их результаты выдавались за доказательства самозарождения. Тем временем открытие Спалланцани нашло интересное *практическое* применение. Его опыты показали, что даже скоропортящиеся растительные или животные настои не загнивают и не начинают бродить, если их освободить от микроскопических организмов. Поэтому казалось вероятным, что эти химические изменения настоев связаны каким-то образом с развитием микробов. В начале XIX в. Франсуа Аппер обнаружил, что можно предохранить пищу от порчи, если поместить ее в герметический контейнер и после этого прогреть. Таким способом ему удалось неограниченно долго сохранять скоропортящиеся пищевые продукты, и этот первый процесс консервирования, получивший название «аппертизации», стал широко применяться для сохранения пищевых продуктов задолго до того, как был окончательно разрешен научный спор о самозарождении.

В конце XVIII в. работами Пристли, Кавендиша и Лавуазье были заложены основы химии газов. Одним из первых был открыт газ кислород, и вскоре выяснилось, что он необходим для жизни животных. В свете этого казалось возможным, что герметическое запечатывание, которое рекомендовал Спалланцани и практически применил Аппер, эффективно вовсе не потому, что оно препятствует проникновению в сосуд микробов из воздуха, а потому, что в сосуд не поступает кислород, который необходим как для роста микробов, так и для брожения или гниения. Поэтому в начале XIX в. велись горячие споры о том, как кислород влияет на эти процессы. В конце концов было показано, что в тщательно прогретом настое даже в присутствии воздуха не происходит ни роста микробов, ни разложения, если соприкасающийся с настоем воздух предварительно обработать таким образом, чтобы в нем не осталось никаких микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПАСТЕРА

К 1860 г. некоторые ученые начали понимать, что между развитием микроорганизмов в органических настоях и происходящими в последних химическими изменениями существует *причинная связь*, т. е. что именно микроорганизмы и вызывают эти изменения. Великим пионером этой области исследований был Луи Пастер (рис. 1.3). Однако для признания этой концепции требовалось доказательство того, что само-

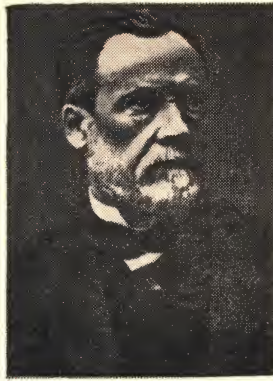


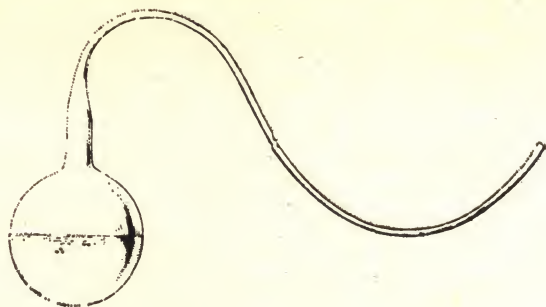
Рис. 1.3. Луи Пастер (1822—1895).
(Любезно предоставлено Институтом Пастера в Париже.)

зарождения не происходит. И Пастер, побуждаемый непрерывными заявлениями сторонников теории самозарождения, в конце концов обратился к исследованию этой проблемы. Его работа была опубликована в 1861 г. под названием «Мемуар об организованных тельцах, находящихся в атмосфере».

Пастер сначала показал, что в воздухе содержатся «организованные тельца», которые можно видеть в микроскоп. Для этого он просасывал большие количества воздуха через трубку с пироксилином, который служил фильтром. Затем он вынимал пироксилин и растворял его в смеси спирта и эфира, а осадок исследовал под микроскопом. Кроме неорганического материала в осадке содержалось значительное число маленьких круглых или овальных телец, неотличимых от микроорганизмов. Затем Пастер подтвердил, что если в прокипяченный настой попадает прогретый воздух, то развития микроорганизмов не происходит. Установив это, он пошел дальше и показал, что если в закрытой системе к стерильному настою добавить кусочек пироксилина, содержащий микробы, то неизбежно начинается их рост. Эти эксперименты показали, каким образом микробы могут попадать в настой, и привели Пастера к самому изящному из его опытов по данной проблеме. Он продемонстрировал, что настои могут оставаться стерильными неопределенно долго и в открытых колбах, если только вытянутое в трубку горлышко колбы изогнуто вниз так, что содержащиеся в воздухе микробы не могут оседать на поверхность настоя. Колба Пастера с таким изогнутым горлышком показана на рис. 1.4. Если горлышко отбить, то настой быстро будет заселен микробами. То же самое произойдет, если, наклонив колбу, перелить находящуюся в ней стерильную жидкость в концевой изгиб горлышка, а затем вернуть ее обратно в сосуд.

В завершение своего исследования Пастер произвел количественное определение содержания микроорганизмов в воздухе и показал, что они распределены в атмосфере отнюдь не равномерно.

Рис. 1.4. Такие колбы с горлышком, вытянутым наподобие лебединой шеи, Пастер использовал при изучении возможности самозарождения. В результате изгиба горлышка воздух в сосуд проходит, а содержащиеся в воздухе микроорганизмы не проникают внутрь.



ОПЫТЫ ТИНДАЛЯ

Тем не менее самые упорные сторонники самозарождения продолжали обороняться еще в течение нескольких лет. Чтобы опровергнуть их доводы, пылкий сторонник Пастера английский физик Джон Тиндаль провел серию экспериментов. В результате он установил важный факт, который не был замечен Пастером и который частично снимал возражения, выдвигаемые сторонниками самозарождения.

В длинной серии опытов с настоями, приготовленными из мяса и свежих овощей, Тиндаль достигал удовлетворительной стерилизации, помещая пробирки с этими настоями на 5 мин в баню с кипящим рассолом. Но когда он провел такие же опыты с настоями, приготовленными из высушенного сена, такая процедура стерилизации оказалась совершенно непригодной. Более того, когда он затем попытался снова повторить свои предыдущие опыты с другими типами настоев, то оказалось, что их уже нельзя простерилизовать погружением в кипящий рассол даже на целый час. Проводя много подобных опытов, Тиндаль наконец понял, что здесь происходило. В высушенном сене содержались споры бактерий, а споры гораздо устойчивее к прогреванию, чем любые микробы, с которыми он имел дело раньше. Из-за присутствия сена в воздухе лаборатории оказалось много спор. Как только Тиндаль осознал это, он попытался определить, насколько термоустойчивы споры сенных бактерий, и обнаружил, что кипячение настоев даже в течение $5\frac{1}{2}$ часов не обеспечивает полностью их стерильности. Из этого он заключил, что у бактерий имеются фазы, одна из которых относительно термолabile (клетка гибнет при кипячении через 5 мин), а другая невероятно термостабильна. Почти тотчас же эти выводы были подтверждены немецким ботаником Фердинандом Коном, который показал, что сенные бактерии могут образовывать отличимые под микроскопом покоящиеся тельца (*эндоспоры*), чрезвычайно устойчивые к прогреванию.

Исходя из этих результатов, Тиндаль начал разрабатывать метод стерилизации путем *прерывистого прогрева*, который позволял бы убить все содержащиеся в настое бакте-

рии. Позднее этот метод был назван *тиндализацией*. Перед тем как прогревать настой, его следует выдержать в течение некоторого времени, чтобы позволить спорам прорасти и таким образом утратить свою термостабильность. Так как растущие бактерии легко убить кратковременным кипячением, можно прогревать такой выдержанный настой в течение очень короткого времени. В случае надобности эту процедуру можно повторить несколько раз, чтобы уничтожить потомство всех спор, почему-либо не успевших прорасти до первого прогрева. Тиндаль нашел, что в результате пяти циклов прогревания и охлаждения настоев становится стерильным даже в том случае, если каждое прогревание длилось всего 1 мин, тогда как единичный длительный прогрев в течение часа не обеспечивает стерильности. Установление факта невероятной термостабильности спор было очень существенно для разработки адекватных методов стерилизации.

Утверждали, что работы Пастера и Тиндаля «опровергли» возможность самозарождения вообще и что оно, следовательно, никогда не имело места. На самом же деле столь решительный вывод нельзя считать оправданным. Мы можем с уверенностью сказать лишь то, что в настоящее время в тщательно простерилизованных органических настоях микроорганизмы спонтанно не возникают. Это, однако, не исключает того, что первоначально жизнь на Земле возникла путем своего рода «самозарождения», хотя это был процесс гораздо более постепенный и сложный, чем то, что имели в виду сторонники теории самозарождения в XVIII—XIX веках.

ОТКРЫТИЕ РОЛИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРЕВРАЩЕНИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

В период длительной дискуссии о возможности самозарождения исследователи часто обнаруживали корреляцию между развитием в органических настоях микроорганизмов и химическими изменениями в самом настое. Такие изменения называли «брожением» или «гниением». Гниение — процесс разложения, в результате которого образуются дурно пахнущие продукты, — характерно для мяса и связано с распадом белков, представляющих собой основной органический компонент такого рода естественных субстратов. Брожение, т. е. процесс, в результате которого образуются спирты или органические кислоты, характерно для растительных материалов и связано с распадом углеводов — важнейших органических компонентов растительных тканей.

БРОЖЕНИЕ КАК БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

В 1837 г. К. Каньяр-Латур, Т. Шванн и Ф. Кютцинг независимо друг от друга высказали предположение, что дрожжи, появляющиеся в процессе спиртового брожения, представляют

собой микроскопические растения и что характерное для спиртового брожения превращение сахаров в этиловый спирт и углекислоту является физиологической функцией дрожжевых клеток. Эти представления подверглись резким нападкам со стороны таких ведущих химиков того времени, как И. Берцелиус, Ю. Либих и Ф. Вёлер, которые считали брожение и гниение процессами чисто химическими. В первые десятилетия XIX в. химия достигла больших успехов, и в 1828 г. был впервые осуществлен синтез органического вещества — мочевины — из неорганических соединений; с этого началось развитие нового раздела химии — органического синтеза. После того как была показана возможность получения в лаборатории таких органических соединений, которые раньше были известны исключительно как продукты жизнедеятельности, химики справедливо сочли, что теперь многие явления природы можно рассматривать с физико-химической точки зрения. Превращение сахаров в спирт и углекислоту представлялось им относительно простым химическим процессом. В связи с этим химики неодобрительно относились к попыткам объяснить подобный процесс как результат жизнедеятельности организмов.

Полно иронии то обстоятельство, что Пастер, который убедил научный мир в *микробиологической природе всех процессов брожения*, сам был по образованию химиком. Он начал изучать процессы брожения в 1857 г. и продолжал эти работы, если не считать небольших перерывов, вплоть до 1876 г. Исследования эти ведут свое начало от практики. Винокуры Лилля, где производство спирта из свекловичного сахара было важной отраслью промышленности, столкнулись с трудностями и призвали на помощь Пастера. Как выяснил Пастер, затруднения были обусловлены тем, что спиртовое брожение частично заменялось брожением другого типа, при котором сахар превращается в молочную кислоту. Когда он исследовал под микроскопом содержащее тех бродильных чанов, где образовалась молочная кислота, он обнаружил, что в них вместо клеток дрожжей, характерных для спиртового брожения, присутствуют гораздо более мелкие палочковидные или сферические клетки. Если ничтожное количество этого материала помещали в раствор сахара с небольшой добавкой мела, то начиналось энергичное молочнокислое брожение и со временем образовывался сероватый осадок, который опять-таки состоял, как показало микроскопическое исследование, из мелких сферических или палочковидных организмов. Последовательный перенос очень малых количеств этого материала в новые сосуды с той же средой всегда приводил к тому, что там начиналось молочнокислое брожение и количество тех же организмов возрастало. Пастер сделал вывод, что этот активный агент — новые «дрожжи» — представляет собой такой микроорганизм, который в процессе

своего роста специфически превращает сахар в молочную кислоту¹.

Пользуясь тем же методом, Пастер в течение последующих 20 лет исследовал много различных типов брожения. Ему удалось показать, что брожение неизменно сопровождается развитием микроорганизмов. Далее он показал, что каждый химический тип брожения, характеризуемый тем или иным главным конечным органическим продуктом (например, молочнокислое, спиртовое или маслянокислое брожение) сопровождается развитием *микроорганизмов определенного типа*. Многие из этих специфических типов микробов можно распознать под микроскопом по их величине и форме. Кроме того, их можно различить и по тем условиям среды, которые благоприятствуют развитию микробов того или иного типа. Один из таких случаев физиологической специфичности был обнаружен Пастером еще в одном из первых его экспериментов: в то время как агент спиртового брожения может процветать в кислой среде, агенты молочнокислого брожения лучше развиваются в нейтральной среде. Именно поэтому Пастер добавлял мел (карбонат кальция) к той среде, которую он использовал для культивирования молочнокислых микроорганизмов. Это вещество служило для нейтрализации среды и препятствовало слишком сильному ее закислению, которое происходило бы в результате образования молочной кислоты.

ОТКРЫТИЕ АНАЭРОБНОЙ ЖИЗНИ

Изучая маслянокислое брожение, Пастер открыл еще один фундаментальный биологический факт. Он обнаружил, что существуют организмы, которые могут жить только в отсутствие свободного кислорода. Исследуя под микроскопом жидкие среды, в которых протекало маслянокислое брожение, Пастер заметил, что у края растекшейся капли, вблизи границы с воздухом, бактерии становятся неподвижными, тогда как находящиеся в центре капли бактерии продолжают двигаться. Это наводило на мысль, что воздух оказывает угнетающее действие на данные микроорганизмы, и Пастер вскоре подтвердил это, показав, что если через бродящую среду продувать воздух, то маслянокислое брожение замедляется, а иногда и полностью прекращается. Из этого он сделал заключение, что некоторые микроорганизмы могут жить только в отсутствие кислорода, хотя раньше этот газ считался совершенно необходимым для поддержания любой формы жизни. Пастер ввел термины «*аэробный*» и «*анаэробный*» для обозначения жизни в присутствии и в отсутствие кислорода.

¹ На самом деле молочнокислое брожение вызывается бактериями, но во времена Пастера микроорганизмы еще не были четко разделены на различные таксономические группы.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БРОЖЕНИЯ

Открытие анаэробной природы маслянокислого брожения дало Пастеру ключ к пониманию той роли, которую процессы брожения играют в жизни осуществляющих его микроорганизмов. Свободный кислород нужен большинству организмов для окисления органических соединений до углекислоты. Такое связанное с кислородом биологическое окисление, которое называют *аэробным дыханием*, дает энергию, необходимую для поддержания организма и для его роста.

Пастер первым осознал, что некоторые организмы могут для получения энергии использовать процесс распада органических соединений в отсутствие кислорода; как он сформулировал, *брожение — это жизнь без воздуха*. Некоторые строго анаэробные микроорганизмы, например маслянокислые бактерии, получают энергию только в результате брожения. Многие другие микроорганизмы, в том числе и некоторые дрожжи, являются *факультативными анаэробами*, так как обладают двумя различными механизмами для получения энергии: в присутствии кислорода они осуществляют аэробное дыхание, но если в среде нет свободного кислорода, то они могут использовать для той же цели брожение. Это было изящно продемонстрировано Пастером, который показал, что в отсутствие воздуха дрожжи превращают сахар в спирт и углекислоту, а в присутствии воздуха спирт совсем или почти не образуется: основным конечным продуктом аэробной реакции является углекислота.

Рост, происходящий за счет того или иного органического вещества, определяется в основном той энергией, которую можно получить при его расщеплении. Брожение — менее эффективный энергетический процесс, чем аэробное дыхание, так как при этом процессе часть содержащейся в окисляемом веществе энергии остается в органических конечных продуктах (например, спирте или молочной кислоте), которые образуются при брожении. Как впервые установил Пастер, расщепление одного и того же количества сахара в анаэробных условиях приводит к существенно меньшему росту дрожжей, чем в аэробных условиях. Это говорит об относительно малой эффективности брожения как источника энергии.

Исследования Пастера показали, что брожение представляет собой жизненно важный процесс, физиологически весьма существенный для многих клеток. Дальнейшее развитие наших представлений о природе брожения связано с наблюдением, которое случайно сделал в 1897 г. Г. Бюхнер. Пытаясь сохранить экстракт, полученный путем растирания дрожжевых клеток с песком, Бюхнер добавил к нему большое количество сахара и с удивлением обнаружил, что из экстракта вы-

деляется углекислота и при этом происходит образование спирта. Так выяснилось, что препарат растворимых ферментов способен осуществлять спиртовое брожение. Открытие Бюхнера положило начало развитию современной биохимии. Детальный анализ механизма спиртового брожения в бесклеточных системах в конце концов привел к расшифровке этого сложного метаболического процесса: оказалось, что это цепь сравнительно простых химических реакций, каждая из которых катализируется специфическим ферментом. Сейчас все биологи принимают как нечто само собой разумеющееся, что даже самые сложные физиологические процессы можно интерпретировать в физико-химических понятиях. В этом смысле оказалось, что правы те химики XIX века, которые интуитивно боролись против биологической теории брожения.

ОТКРЫТИЕ РОЛИ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ

Пастер всегда заботился о практическом применении результатов своих научных исследований, и поэтому, изучая брожение, он много внимания уделил порче пива и вина, которая, как он показал, вызывается развитием нежелательных микроорганизмов. При описании таких процессов Пастер использовал своеобразный и знаменательный термин, называя их «болезнями» пива и вина. Действительно, он уже думал о том, что микроорганизмы, возможно, служат возбудителями инфекционных болезней у высших организмов. В то время были известны некоторые факты, подкрепляющие эту мысль. В 1813 г. было показано, что определенные грибы могут вызывать болезни пшеницы и ржи, а в 1845 г. М. Беркли выяснил, что катастрофическое поражение картофеля в Ирландии — стихийное бедствие, которое сильно повлияло на историю этой страны, — было вызвано грибом. Тот факт, что грибы могут быть специфически связаны с заболеваниями животных, впервые был установлен в 1836 г. А. Басси, изучавшим грибковые заболевания шелковичного червя в Италии. Несколько лет спустя И. Шёнлейн показал, что некоторые кожные болезни человека также вызываются грибковой инфекцией. Несмотря на это, лишь очень немногие медики были готовы признать, что важнейшие инфекционные болезни человека могут вызываться микроорганизмами, и еще меньше людей верило, что такие мелкие и, по-видимому, простые организмы, как бактерии, могут быть возбудителями болезней.

АНТИСЕПТИКА В ХИРУРГИИ

Около 1840 г. в медицинскую практику была введена анестезия, и это сразу же открыло широкие возможности для развития хирургических методов лечения. Требования быстроты

отступили на второй план, и хирурги могли теперь производить такие длительные и сложные операции, о которых раньше нельзя было и подумать. Однако, по мере того как совершенствовалась техника хирургических операций, все более серьезной становилась давняя проблема *хирургического сепсиса*, т. е. инфекции после оперативного вмешательства, часто приводившей к гибели больных. Исследования Пастера, посвященные проблеме самозарождения, показали, что в воздухе содержатся микроорганизмы, и одновременно был найден ряд мер, исключающих попадание микробов в органические настои и их развитие. Молодой английский хирург Джозеф Листер, на которого работы Пастера произвели глубокое впечатление, понял, что хирургический сепсис может быть результатом микробной инфекции тканей, обнажаемых при операции. Он решил разработать меры, которые предотвращали бы попадание микроорганизмов в хирургические раны. Тщательно стерилизуя хирургические инструменты, дезинфицируя перевязочный материал и проводя операции под распыляемым дезинфицирующим раствором (чтобы предотвратить заражение из воздуха), он добился резкого снижения частоты случаев хирургического сепсиса. Антисептические методы хирургии, разработанные Листером около 1864 г., сначала были встречены с недоверием, однако постепенно было признано, что они очень сильно снижают вероятность сепсиса при операциях, и эти методы вошли в широкую практику. Это было веским *косвенным* доводом в пользу микробной теории болезней, хотя и не прояснило вопроса о возможной роли микробов как возбудителей определенных болезней человека. Как за полвека до этого, когда Аппер разработал метод консервирования пищевых продуктов, так и при введении Листером методов хирургической асептики практика опередила теорию.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭТИОЛОГИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

То, что бактерии могут быть специфическими возбудителями инфекционных болезней, было открыто при изучении сибирской язвы — серьезного инфекционного заболевания домашних животных, которое передается и человеку. На последних стадиях генерализованной инфекции в кровяном русле в огромных количествах появляются палочковидные бактерии, вызывающие эту болезнь. Впервые они были обнаружены еще в 1850 г., и в последующие 15 лет различные авторы сообщали об их присутствии в крови зараженных животных. Особенно тщательные и детальные исследования проводил между 1863 и 1868 гг. К. Давен, который показал, что эти палочки всегда присутствуют у больных, но никогда не встречаются у здоровых животных и что можно заразить здоровое животное путем введения ему крови, содержащей эти палочки.

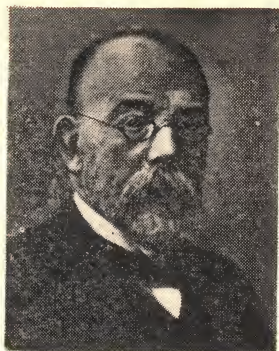


Рис. 1.5. Роберт Кох (1843—1910).
(Любезно предоставлено Народным предприятием Георг Тиме, Лейпциг).

Окончательно бактериальная *этиология* сибирской язвы (т. е. то, что эта болезнь вызывается бактериями) была доказана в 1876 г. немецким сельским врачом Робертом Кохом (рис. 1.5). Лаборатории у Коха не было, и он проводил опыты дома, используя очень примитивное оборудование и мелких подопытных животных. Кох показал, что мышь можно заразить материалом, взятым от больного домашнего животного. Производя инокуляцию от мыши к мыши, он передал эту болезнь последовательно 20 мышам и при каждом переносе наблюдал характерные симптомы. Затем он начал культивировать вызывающие болезнь бактерии, помещая небольшие, сильно зараженные кусочки селезенки больных животных в капли стерильной сыворотки. Наблюдая час за часом рост организмов в такой культуральной среде, Кох увидел, как палочки превращаются в длинные нити, внутри которых со временем появляются овальные тельца, сильно преломляющие свет. Он показал, что эти тельца, которых ранее не наблюдали, представляют собой споры (рис. 1.6). Когда содержащий споры материал переносили в новую каплю стерильной сыворотки, споры прорастали и опять давали начало типичным палочкам. Таким образом Кох последовательно восемь раз пересеивал бактериальную культуру. При введении последней культуры из такой серии здоровому животному она тоже вызывала развитие характерной болезни, а от этого животного снова можно было выделить микроорганизмы и получить их культуру.

Эти опыты отвечали требованиям, сформулированным за 36 лет до того Ф. Генле,— критериям, которым должны удовлетворять эксперименты, подтверждающие причинную связь между данным микроорганизмом и определенной болезнью. В обобщенной форме эти критерии таковы: 1) данный микроорганизм должен присутствовать в каждом случае данной болезни; 2) микроорганизм должен быть выделен из заболевшего хозяина и должна быть получена его чистая культура; 3) эта чистая культура при введении ее восприимчивому хозяину должна вызывать данную болезнь; 4) долж-

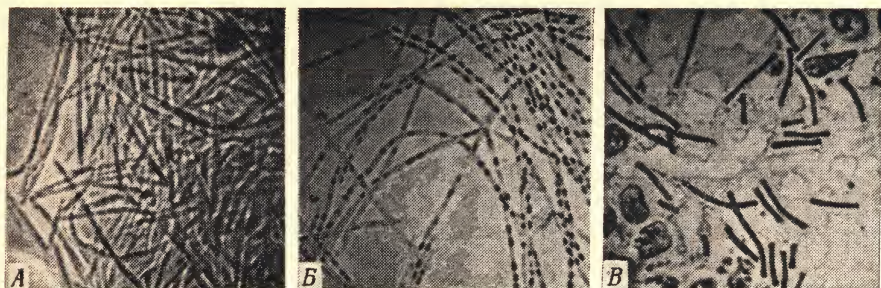


Рис. 1.6. Первые микрофотографии бактерий, полученные Робертом Кохом в 1877 г. А — неокрашенные цепочки вегетативных клеток *Bacillus*

anthracis. Б — неокрашенные цепочки *B. anthracis*; клетки содержат сильно преломляющие свет споры. В — окрашенный мазок *B. anthra-*

cis из селезенки зараженного животного. Видны палочковидные бациллы и более крупные тканевые клетки.

но быть показано, что тот же микроорганизм вновь можно выделить из экспериментально зараженного животного. Так как Кох первым применил эти критерии в эксперименте, их теперь называют обычно *постулатами Коха*.

Кох провел также другую серию опытов, в которой продемонстрировал *биологическую специфичность* возбудителя болезни. Он показал, что инъекция другой спорообразующей бактерии — сенной палочки — не приводит к заболеванию сибирской язвы, и ему удалось также отличить возбудителя сибирской язвы от бактерий, вызывающих другие заболевания. На основании полученных результатов Кох заключил, что «данное специфическое заболевание способен вызывать лишь один тип бацилл, а введение других бактерий либо вообще не вызывает болезни, либо приводит к другим заболеваниям».

Тем временем Пастер подыскал себе сотрудника, знакомого с вопросами медицины, — Ж. Жубера. Не зная о работе Коха, Пастер и Жубер предприняли изучение сибирской язвы. Они не смогли добавить ничего нового к тем выводам, которые были сделаны Кохом, но подтвердили его результаты и получили дополнительные доказательства, что именно эта палочка, а не какая-нибудь другая бактерия является специфическим возбудителем данной болезни.

БЫСТРЫЙ ПРОГРЕСС МЕДИЦИНСКОЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Работы по изучению сибирской язвы явились началом золотого века медицинской бактериологии. В этот период институты, созданные в Париже для Пастера и в Берлине для Коха, стали мировыми центрами бактериологической науки. Возглавляемая Кохом немецкая школа сосредоточила свои

усилия в основном на выделении, культивировании и описании возбудителей важнейших инфекционных болезней человека. Руководимая Пастером французская школа почти сразу же обратилась к более тонкой и сложной проблеме — к экспериментальному изучению патогенеза инфекционных болезней, механизмов выздоровления и выработки иммунитета. За 25 лет было открыто и описано большинство важнейших бактерий, вызывающих болезни у человека, были разработаны методы искусственной иммунизации и гигиенические меры для предотвращения многих из этих болезней. Это было, несомненно, самым грандиозным переворотом в медицине за всю историю человечества.

ОТКРЫТИЕ ФИЛЬТРУЮЩИХ ВИРУСОВ

В самом начале деятельности нового института, руководимого Пастером, в нем были разработаны фильтры, способные задерживать клетки бактерий; это дало возможность получать не содержащие бактерий фильтраты. Инфекционные жидкости часто проверяли на присутствие в них болезнетворных бактерий, пропуская их через такие фильтры. Если фильтрат был неинфекционным, это указывало на то, что в исходной жидкости содержится бактерия-возбудитель. В 1892 г. русский ученый Д. Ивановский использовал этот метод для исследования инфекционного экстракта из растений табака, пораженных мозаичной болезнью. К своему удивлению, он обнаружил, что профильтрованный экстракт полностью сохранял свою инфекционность. Открытие Ивановского было вскоре подтверждено, и в течение нескольких лет было обнаружено, что многие весьма распространенные болезни растений и животных вызываются подобными же субмикроскопическими агентами, проходящими через бактериальные фильтры. Так был открыт целый класс инфекционных организмов, которые оказались гораздо мельче всех известных ранее. Эти организмы были названы *вирусами*. Истинная природа вирусов в течение многих десятилетий оставалась неясной, но в конце концов было установлено, что они представляют собой особую группу биологических объектов, совершенно отличных от всех клеточных организмов и по структуре, и по способу развития (см. гл. 12).

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Пастер обладал интуитивным искусством работы с микроорганизмами. Поэтому, хотя он и работал с культурами, содержащими смесь разных форм микробов, ему удалось сделать правильные выводы о специфичности процессов брожения. Классические исследования сибирской язвы, проведенные Ко-

хом и Пастером, прочно утвердили микробную теорию возникновения болезней животных; однако на самом деле условия проведения этих опытов не давали уверенности, что были получены действительно чистые культуры организма-возбудителя. Работа со смешанными популяциями микробов изобилует ловушками, и не все те, кто работал с микроорганизмами в середине XIX века, были так искусны, как Пастер или Кох. Многие утверждали, что микроорганизмы способны в широких пределах изменять свою *морфологию и физиологические свойства*. Это учение известно под названием *плеоморфизма*, тогда как противоположная точка зрения, согласно которой микроорганизмы обладают постоянными, специфическими признаками, получила название *мономорфизма*.

ИСТОКИ ВЕРЫ В ПЛЕОМОРФИЗМ

Посмотрим, что происходит после внесения в питательный раствор смешанной популяции микробов. В этом случае сразу же вступает в действие естественный отбор, и скоро в популяции начинают преобладать те микробы, которые в данных условиях растут быстрее. В результате роста и химической активности этих микроорганизмов состав среды будет изменяться. Через некоторое время условия среды изменятся настолько, что рост формы, первоначально преобладавшей в популяции, станет невозможным. Создавшиеся теперь условия могут оказаться благоприятными для роста других микроорганизмов, которые также были внесены в эту питательную среду, но до сих пор не могли в ней развиваться; тогда они постепенно вытеснят первых и сделаются преобладающей формой. Таким образом, в одном культуральном сосуде, засеянном смешанной популяцией, можно наблюдать *последовательное развитие нескольких разных видов микробов*. Если через короткие интервалы производить повторный перенос смешанной популяции на свежую среду того же состава, то часто удастся поддерживать преобладание в культуре той формы, которая развилась в ней первоначально. По сути дела это и есть тот способ, который использовал Пастер, изучая брожение.

Если не учитывать возможность такой смены микробов в смешанной культуре, то легко сделать вывод, что наблюдаемые морфологические и химические изменения отражают *трансформацию, которую претерпевает отдельный вид*. Именно на таких наблюдениях основывались частые утверждения о крайней вариабельности микроорганизмов в период между 1865 и 1885 гг.

Термин «плеоморфизм» (в переводе с греческого это означает «учение о множественных формах») подразумевает как будто, что речь шла в основном о возможности морфологических изменений. В действительности же часто это было

не так. Многие сторонники плеоморфизма настаивали и на функциональной изменчивости. С их точки зрения, не существовало ни специфических микробов, осуществляющих спиртовое брожение, ни специфических возбудителей определенных болезней: они считали, что и форма, и функции микробов определяются лишь условиями среды. Широкое распространение и живучесть таких взглядов представляли угрозу для развития микробиологии, и им оказывали сопротивление лидеры этой новой науки Пастер, Кох и Кон, которые были сторонниками мономорфизма, провозглашающего постоянство форм (и функций) микробов.

Около 1870 г. микробиологи начали понимать, что верное представление о форме и функции микроорганизма можно получить лишь при работе с чистыми культурами, исключая теми сложности, которые возникают при исследовании смешанных микробных популяций. *Чистой культурой называется такая культура, которая содержит микроорганизмы только одного вида.* Ведущими сторонниками использования чистых культур были два выдающихся миколога А. де Бари и О. Брефельд.

ПЕРВЫЕ ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ

В первоначальной разработке метода чистых культур многое было сделано Брефельдом, который занимался грибами. Брефельд ввел в практику метод выделения отдельных клеток и культивирование грибов на твердых средах, для чего он добавлял к используемой им среде желатину. Применение им методов получения чистых культур давали прекрасные результаты при работе с грибами, но оказалось, что ими нельзя пользоваться при работе с имеющими меньшие размеры бактериями. Работа с бактериями требовала других методов. Одним из первых был предложен *метод разведения*. Жидкость, содержащую смесь бактерий, разводили стерильной средой, надеясь на то, что в конце концов можно будет получить культуру, возникшую из одной-единственной клетки. На практике этот метод утомителен, труден и ненадежен. Кроме того, с его помощью в лучшем случае можно выделить в чистом виде лишь тот микроорганизм, который преобладал в исходной смеси.

Кох очень быстро понял, что для развития новой науки жизненно необходимо разработать простые методы получения чистых культур. Метод разведения явно был слишком трудоемок и ненадежен, чтобы его можно было использовать в повседневной работе. Более перспективный подход намечался в результате наблюдений, сделанных ранее И. Шрётером. Этот исследователь обратил внимание, что на таких субстратах, как картофель, клейстер, хлеб или яичный белок, бактерии вырастают в виде отдельных скоплений, или *коло-*

ний. Колонии отличались друг от друга, но в пределах каждой колонии все бактерии были однотипными. Сначала Кох использовал в своих опытах стерильные срезы картофеля, которые он помещал в стерильные, накрытые крышкой стеклянные сосуды и засеивал бактериями. Однако картофель явно не подходил для этой цели: поверхность среза оказывалась влажной, и это позволяло подвижным бактериям свободно распространяться по ней; кроме того, этот субстрат непрозрачен, и поэтому колонии часто трудно было разглядеть; и наконец, что самое важное, для многих бактерий картофель является плохой питательной средой. Кох понял, что было бы гораздо лучше подобрать какое-нибудь прозрачное вещество, способное сделать твердыми уже испытанные в работе жидкие среды. Таким способом можно было бы приготовить полупрозрачный гель, на котором хорошо выявлялись бы вырастающие колонии. В то же время, изменяя состав жидкой основы, можно было бы удовлетворять пищевые потребности самых разных бактерий. Исходя из этих соображений, Кох в качестве гелеобразователя использовал желатину. После того как желатина застынет, ее поверхность засеивали небольшим количеством бактериальных клеток (*инокулятом*). Для этого инокулят брали платиновой петлей, простерилизованной в пламени, и затем быстро и без нажима проводили ею несколько раз по поверхности застывшей желатины. Вскоре на поверхности появлялись отдельные колонии бактерий, каждую из которых можно было очистить, повторив такой рассев. Этот метод выделения бактерий получил название метода посева *штрихом*. Затем чистые культуры переносили в закрытые ватой пробирки, содержащие стерильную питательную среду с желатиной, которая застыла, когда пробирка находилась в наклонном положении. Такие культуры получили название *косяковых*. Вскоре после этого Кох обнаружил, что можно не рассевать бактерии штрихом по поверхности уже застывшей желатины, а смешивать их с расплавленной желатиной. Когда желатина застынет, бактерии будут иммобилизованы в ней и также дадут начало отдельным колониям. Этот метод получил название *глубинного посева*.

Желатина, вначале использованная Кохом для приготовления твердых сред, имела ряд недостатков. Это белок, который очень легко расщепляется микробами и в результате этого разжижается. Кроме того, гель желатины превращается в золь при температуре выше 28 °С. Вскоре стали использовать в качестве отвердителя другое вещество — *агар*, сложный полисахарид, который выделяют из красных водорослей. Чтобы расплавить агар, нужно нагреть его до 100 °С, так что он остается твердым во всем диапазоне температур, при которых выращивают бактерии. Однако, будучи расплавлен, агар остается жидким до тех пор, пока температура не упа-

дет примерно до 44 °С. Это дает возможность использовать его для глубинного посева. Агар образует достаточно твердый и прозрачный гель. Кроме того, он представляет собой сложный углевод, разрушать который могут лишь относительно немногие бактерии, так что редко приходится сталкиваться с его разжижением. Поэтому агар быстро заменил желатину как материал для приготовления твердых бактериологических сред. Попытки найти столь же совершенный синтетический заменитель агара успеха не имели.

РАЗРАБОТКА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД КОХОМ И ЕГО ШКОЛОЙ

Для селективного выращивания микроорганизмов, вызывающих брожение, Пастер использовал простые прозрачные жидкие среды известного химического состава. Для выделения возбудителей болезней нужны были иные типы культуральных сред, и разработка таких сред составляла вторую главную методическую проблему, решением которой занялся Кох со своими сотрудниками. Обычно патогенные бактерии развиваются в тканях зараженного хозяина; поэтому представлялось логичным, что для их успешного культивирования вне тела животного следует использовать среду, наиболее близкую к той, которую микроб находит в тканях хозяина. Исходя из этих соображений, Кох стал использовать в качестве основных ингредиентов культуральных сред *мясные настои и экстракты*. В результате проведенных опытов появились *питательный бульон* и соответственно *твердый питательный агар*, которые и до сих пор используются в обычных бактериологических работах чаще любых других сред. Питательный бульон содержит 0,5% пептона (ферментативного перевара мяса), 0,3% мясного экстракта (концентрата водорастворимых компонентов мяса) и 0,8% NaCl; это обеспечивает в среде приблизительно ту же концентрацию соли, что и в животных тканях. Для культивирования более требовательных патогенных организмов в эту основную среду могут быть введены различные добавки (например, сахар, кровь или сыворотка). Учитывая специфическую цель, для которой были предназначены эти среды, можно счесть выбор ингредиентов логичным, хотя традиционное включение в среду NaCl вряд ли имеет какое-либо реальное значение, поскольку многие бактерии нечувствительны к изменению концентрации соли в очень широком диапазоне. Со временем многие бактериологи стали считать, что такие среды универсальны, т. е. пригодны для культивирования почти всех бактерий. Но это не так: бактерии сильно различаются по своим потребностям в питательных веществах, и каждая среда способна поддерживать рост лишь очень небольшой части существующих в природе бактерий (см. гл. 2).

МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ГЕОХИМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

В конце прошлого века интерес микробиологов был сосредоточен в основном на той роли, которую играют микроорганизмы как возбудители инфекционных болезней. Тем не менее некоторые ученые продолжали развивать направление исследований, начатое ранними работами Пастера, касавшимися брожения. Эти исследования ясно показали, что микроорганизмы могут служить специфическими агентами, вызывающими химические превращения в очень больших масштабах, и что мир микробов в целом, весьма вероятно, ответствен за множество различных геохимических изменений.

Установление кардинальной роли микроорганизмов в биологически важных круговоротах материи на Земле — круговороте углерода, азота и серы — это в значительной части результат работы двух исследователей, С. Виноградского (рис. 1.7) и М. Бейеринка (рис. 1.8). В отличие от животных и растений микроорганизмы чрезвычайно разнообразны по своей физиологии. Многие их группы специализированы и способны осуществлять химические превращения, совершенно недоступные ни растениям, ни животным; тем самым они играют крайне важную роль в круговороте веществ на Земле.

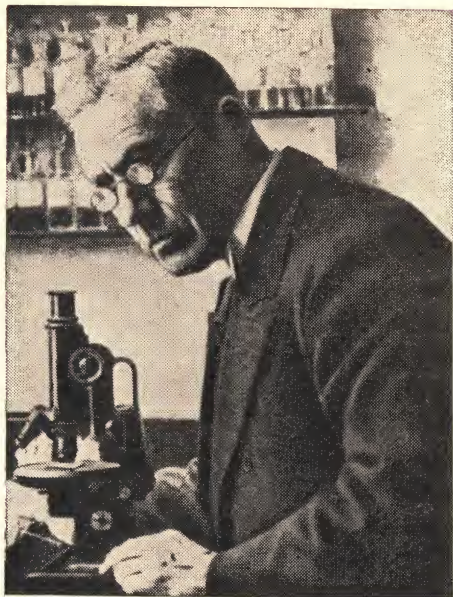
Примером такой физиологической специализации микробов могут служить открытые Виноградским автотрофные бактерии. Эти бактерии могут расти в минеральных средах, получая необходимую для роста энергию путем окисления восстановленных неорганических соединений и используя в качестве источника углерода углекислоту. Виноградский обнаружил, что есть несколько физиологически различных групп автотрофных бактерий, каждая из которых способна использовать какие-то определенные минеральные вещества в качестве источника энергии; так, например, серные бактерии могут окислять неорганические соединения серы, а нитрифицирующие бактерии — неорганические соединения азота.

Другое открытие, сделанное Виноградским и Бейеринком, касается роли микробов в фиксации атмосферного азота, который большинство живых организмов в качестве источника азота использовать не могут. Эти исследователи показали, что определенные бактерии, из которых одни — симбионты высших растений, а другие — свободноживущие формы, могут использовать газообразный азот для синтеза своих клеточных компонентов. Эти микроорганизмы пополняют запасы связанного азота, в котором нуждаются все другие формы жизни.



Рис. 1.7. Сергей Виноградский (1856—1953). (Фото любезно предоставлено Мэсон и Ко., Париж; воспроизводится с разрешения Annales de l'Institut Pasteur.)

Рис. 1.8. Мартинус Виллем Бейеринк (1851—1931). (Фото любезно предоставлено М. Нийхофом, Гаага.)



МЕТОДЫ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Для выделения и изучения различных существующих в природе физиологических групп микроорганизмов Виноградский и Бейеринк разработали совершенно новый и очень важный метод *накопительных культур*. По существу это приложение принципа естественного отбора к микромиру. Исследователь prepares среду определенного химического состава, засекает ее смешанной микробной популяцией, например бактериями, содержащимися в небольшом образце почвы, и через некоторое время выясняет, какие микроорганизмы преобладают в культуре. Преобладание тех или иных форм обусловлено их способностью расти в данной среде быстрее всех других организмов, имевшихся в инокуляте. Поэтому и среды называют «накопительными». Например, если мы хотим вызвать такие микроорганизмы, которые могут использовать атмосферный азот (N_2) в качестве единственного источника этого элемента, то готовится среда, в которой *нет связанного азота*, но имеются все другие необходимые для роста питательные вещества — источники энергии, источники углерода и минеральные соли. Затем в эту среду вносят образец

почвы, помещают в атмосферу N_2 и инкубируют при тех или иных заданных физических условиях. Так как азот — необходимый компонент каждой живой клетки, то в такой среде смогут размножаться лишь те присутствующие в инокуляте микроорганизмы, которые могут фиксировать атмосферный азот. Если в образце почвы есть такие микроорганизмы, то они будут расти. Возможны бесчисленные модификации опытов такого типа: можно изменять и источник углерода, и источник энергии, и температуру, и концентрацию водородных ионов. При каждом данном сочетании этих условий в культуре будут преобладать микроорганизмы какого-то определенного типа, если, конечно, в инокуляте вообще были организмы, способные расти при таких условиях. Таким образом, метод накопительных культур — одно из наиболее мощных средств, имеющихся в распоряжении микробиологов. С его помощью можно выделять микроорганизмы, обладающие любыми заданными потребностями, если только они существуют в природе.

РАЗВИТИЕ МИКРОБИОЛОГИИ В ДВАДЦАТОМ ВЕКЕ

В последние десятилетия XIX в. микробиология стала вполне сложившейся наукой с собственными концепциями и методами, причем и методы, и концепции ее выросли в основном из работ Пастера. Одновременно зародилась и общая биология. Это произошло благодаря Чарлзу Дарвину, который по-новому упорядочил и обобщил накопившиеся данные на основе теории эволюции путем естественного отбора. По логике вещей микробиология наряду с другими частными биологическими дисциплинами должна была бы занять свое место в структуре последарвиновской общей биологии. В действительности, однако, этого не произошло. После смерти Пастера в 1895 г. в течение полувека микробиология и общая биология развивались почти независимо друг от друга. В этот период главными направлениями в микробиологии были изучение возбудителей инфекционных болезней, исследование иммунитета и его роли в предупреждении болезней и в процессе выздоровления, поиски химиотерапевтических средств и анализ химической активности микроорганизмов.

И в теоретическом, и в экспериментальном плане все эти проблемы были далеки от основных интересов биологии начала XX в., которые касались организации клетки, ее роли в процессах размножения и развития, механизмов наследственности и эволюции растений и животных. Даже характерные для микробиологии оригинальные методические нововведения мало интересовали биологов того времени. Ценность их была полностью осознана лишь около 1950 г., когда биологи

начали широко использовать культуры растительных и животных тканей и клеток.

Микробиология, однако, внесла существенный вклад в развитие другой новой науки — биохимии. Открытие Бюхнером бесклеточного спиртового брожения (см. стр. 21) явилось ключом к химическому изучению метаболических процессов, доставляющих энергию. В течение первых двух десятилетий XX в. параллельно развивались исследования механизма гликолиза в мышцах и механизма спиртового брожения у дрожжей, и постепенно выявилось фундаментальное сходство этих процессов. Физиологи, изучавшие позвоночных животных, и биохимики, изучавшие микробов, совершенно неожиданно обнаружили под собой общую почву. Несколько лет спустя, при изучении питания животных и микробов, был найден еще один «общий знаменатель»: оказалось, что необходимые животным в следовых количествах витамины химически идентичны «ростовым факторам», в которых нуждаются некоторые бактерии и дрожжи. При детальном изучении функций этих веществ, по соображениям удобства проводившемся в значительной части на микроорганизмах, было установлено, что они служат предшественниками в биосинтезе ряда коферментов, необходимых для клеточного метаболизма. Эти открытия, сделанные в период с 1920 по 1935 г., показали, что на биохимическом уровне все живые системы в основе своей очень сходны. В результате биохимии и микробиологи провозгласили концепцию «единства биохимии».

Второе важнейшее событие в биологии начала XX века — возникновение науки генетики в результате конвергенции цитологии и менделеевского анализа — не оказало немедленного влияния на микробиологию. Долгое время казалось сомнительным, чтобы у бактерий были такие же механизмы наследственности, как у растений и животных. Генетика и микробиология впервые пришли в тесное соприкосновение в 1941 г., когда Бидлу и Татуму удалось выделить ряд биохимических мутантов гриба *Neurospora*. Эти работы открыли путь для биохимического анализа последствий мутаций, и нейроспора стала наравне с плодовой мушкой и кукурузой важнейшим объектом генетических исследований.

Изучение мутаций у бактерий, которое провели в 1943 г. Дельбрюк и Лурна, заложило методические и концептуальные основы генетики этих микроорганизмов. Вскоре было показано, что у бактерий существует несколько механизмов генетического переноса, причем все они существенно отличаются от механизма половой рекомбинации у растений и животных. В 1944 г. Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти исследовали процесс переноса генетического материала у бактерий, приводящий к трансформации, и установили, что трансформирующим фактором служит свободная дезоксирибонуклеино-

вая кислота (ДНК). Так была раскрыта химическая природа генов.

Слияние микробиологии, генетики и биохимии в период между 1940 и 1945 гг. положило конец длительной изоляции микробиологии от главных направлений биологической науки. Оно подготовило также условия для второго важнейшего события в биологии, в которое микробиологи внесли фундаментальный вклад,— для развития молекулярной биологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Brock T. D.* (ed. and transl.), 1961, *Milestones in Microbiology*, Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall.
Bulloch W., 1960, *The History of Bacteriology*, New York, Oxford University Press.
Dobell C., 1932, *Antony van Leeuwenhoek and His «Little Animals»*, London, Staples Press.
Dubos R., 1950, *Louis Pasteur Free Lance of Science*, Boston, Little, Brown.
Jacob F., 1974, *The Logic of Living Systems*, London, Allen Lane.
Large E. C., 1940, *Advance of the Fungi*, London, Jonathan Cape.
Stent G. (ed.), 1966, *Phage and the Origins of Molecular Biology*, Cold Spring Harbor, N. Y., Laboratory of Quantitative Biology.
Watson J. D., 1968, *The Double Helix*, New York, Atheneum.

Обзоры

- van Niel C. B.* (1955), *Natural Selection in the Microbial World*, *J. Gen. Microbial.*, 13, 201.

2 МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Так как размеры микроорганизмов очень малы, при изучении отдельных индивидуумов можно получить лишь ограниченную информацию об их свойствах. Поэтому обычно микробиологи изучают популяции, состоящие из миллионов и миллиардов особей. Такие популяции, или *культуры*, получают, выращивая микроорганизмы при более или менее определенных условиях. Культуру, содержащую микроорганизмы только одного вида, называют *чистой* или *аксенической*, а культуру, в которой содержится более чем один вид микроорганизмов, — *смешанной*. Если же в культуре растут только два вида микроорганизмов, причем их специально поддерживают в ассоциации друг с другом, то такая культура называется двухкомпонентной.

Таким образом, основу микробиологических методов составляют две процедуры: *выделение*, т. е. изоляция определенного микроорганизма из существующих в природе смешанных популяций, и *культивирование* — выращивание микробной популяции в искусственной (культуральной) среде в лабораторных условиях. С каким бы видом ни работал микробиолог, он всегда будет использовать эти две процедуры. Они в принципе одинаковы при изучении вирусов, бактерий, грибов, водорослей, простейших и даже очень мелких беспозвоночных животных. Более того, в последние годы аналогичные методы стали применяться и при работе с линиями клеток или тканей высших растений и животных (*культура ткани*). Несмотря на все биологическое разнообразие организмов, с которыми имеет дело микробиология, ее единство как науки обусловлено именно тем, что в ней всегда используются эти основные методы.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Микроорганизмы вездесущи, поэтому получение чистой культуры не сводится только к тому, чтобы выделить данный вид из смешанной природной популяции микробов: нужно еще поддерживать выделенный организм и его потомство в таких искусственных условиях, которые исключали бы загрязнение культуры другими видами. Для развития микроорганизмов не требуется много места; поэтому можно создать необходимые условия в пробирке, колбе или чашке Петри. Эти три типа сосудов наиболее широко используются для культивирования микроорганизмов. Культуральный сосуд сначала

должен быть *простерилизован* (т. е. в нем должно быть уничтожено все живое), а затем, после того как в него будут внесены исследуемые микроорганизмы, защищен от загрязнения извне. Основным источником загрязнения — воздух, в котором всегда содержатся микроорганизмы. Крышка, накрывающая чашку Петри, специально предназначена для того, чтобы предотвращать попадание внутрь микробов из воздуха. Пробирки и колбы с той же целью затыкают пробками. Обычно для этого используют ватные пробки, хотя теперь часто применяют, особенно для пробирок, металлические колпачки или закручивающиеся пластмассовые крышки.

Наружная поверхность культурального сосуда, конечно, тоже может служить источником загрязнения; когда колбу или пробирку открывают, чтобы внести в нее материал или взять пробу, внутрь могут попасть посторонние организмы. Чтобы этого избежать, сразу после того, как пробка вынута, и еще раз непосредственно перед закрыванием сосуда его горлышко обжигают в пламени.

Обычно *инокулят* (микробный материал, используемый для засева, или инокуляции, среды в культуральном сосуде) вносят на металлической проволочке или петле, которую перед самым использованием быстро стерилизуют в пламени. Жидкие культуры переносят также с помощью пипетки. Для этого тот ее конец, который берут в рот, затыкают ваткой, пипетку заворачивают в бумагу или помещают в стеклянный или металлический пенал и стерилизуют. Бумага или пенал предотвращает загрязнение как внутренней, так и внешней поверхности пипеток вплоть до их использования.

Чтобы еще больше снизить вероятность случайного загрязнения, можно пересевать культуры в настольном боксе или в небольшой закрытой комнате, куда поступает специально обработанный воздух, с пониженным содержанием микробов.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР ПУТЕМ ВЫСЕВА НА ЧАШКИ

Чистые культуры микроорганизмов, образующих на твердых средах отдельные колонии (т. е. большинства бактерий, дрожжей, многих мицелиальных грибов и одноклеточных водорослей), проще всего выделять, используя одну из модификаций метода высева на чашки. Этот метод основан на том, что отдельные организмы иммобилизуются на поверхности или в глубине питательной среды, в которую добавлен агар или какое-нибудь другое гелеобразующее вещество. Рост каждого жизнеспособного организма приводит к образованию отдельной колонии, из которой легко сделать пересев на новую среду.

Обычно чаще всего для этой цели используют *посев на чашки штрихом*. Стерилизованную изогнутую проволочку окунают в разведенную надлежащим образом взвесь микроорганизмов и затем проводят ею ряд параллельных несоприкасающихся штрихов по поверхности уже застывшего слоя агара в чашке. При каждом последующем штрихе происходит постепенное разведение инокулята, так что даже если первые штрихи и дадут сплошной рост, то вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии (рис. 2.1). Выделение можно проводить также и методом *глубинного посева*. Для этого последовательные разведения инокулята смешивают с расплавленной, но уже охлажденной агаризованной средой, а затем эти пробы выливают в стерильные чашки Петри, в которых они застывают. В результате колонии образуются в глубине агара.

Особые проблемы возникают при выделении методом посева на чашки строго анаэробных бактерий. Если контакт с кислородом не приводит сразу же к гибели исследуемых организмов, то можно производить посев в чашки как обычно, но затем инкубировать их в закрытых контейнерах, из которых путем химической абсорбции или сжигания горючего материала удален кислород. Для выделения более чувствительных к кислороду анаэробов лучше, однако, использовать модификацию метода глубинного посева, известную под названием культуры, разведенной размешиванием. В этом случае засевают пробирку с расплавленным и охлажденным агаром, содержимое пробирки перемешивают и примерно одну десятую его переносят в следующую пробирку с агаром. Содержимое этой пробирки также перемешивают и используют для засева третьей пробирки и так далее. После 6—10 последовательных разведений пробирки быстро охлаждают и запечатывают, нанося на поверхность слой стерильного вазелина и парафина, что препятствует проникновению воздуха в столбик агара. В таких культурах колонии вырастают внутри агара (рис. 2.2), и в результате их не так просто достать для переноса. Для этого удаляют с помощью стерильной иглы слой вазелина и парафина, а столбик агара осторожно выдувают из пробирки в стерильную чашку Петри, пропуская не содержащий кислорода газ через капиллярную пипетку, опущенную между стенкой пробирки и агаром. Чтобы можно было изучать и переносить колонии, столбик агара разрезают стерильным ножом на диски.

Если используется подходящая методика, то при выделении бактерий из смешанной природной популяции часто уже в первой серии чашек или культур, разведенных размешиванием, вырастают хорошо отделенные друг от друга колонии. Можно ли, взяв материал из такой колонии и засевав им подходящую среду, считать, что получена чистая культура? Нередко так и поступают, однако выделенная культура может

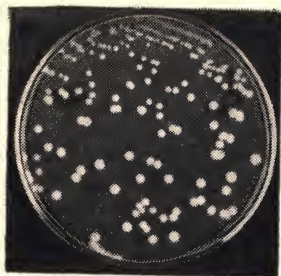


Рис. 2.1. Выделение чистой культуры при посеве штрихом. На чашку Петри с питательным агаром была посеяна штрихом суспензия бак-

териальных клеток. Каждая клетка дала начало макроскопической колонии, видимой невооруженным глазом.

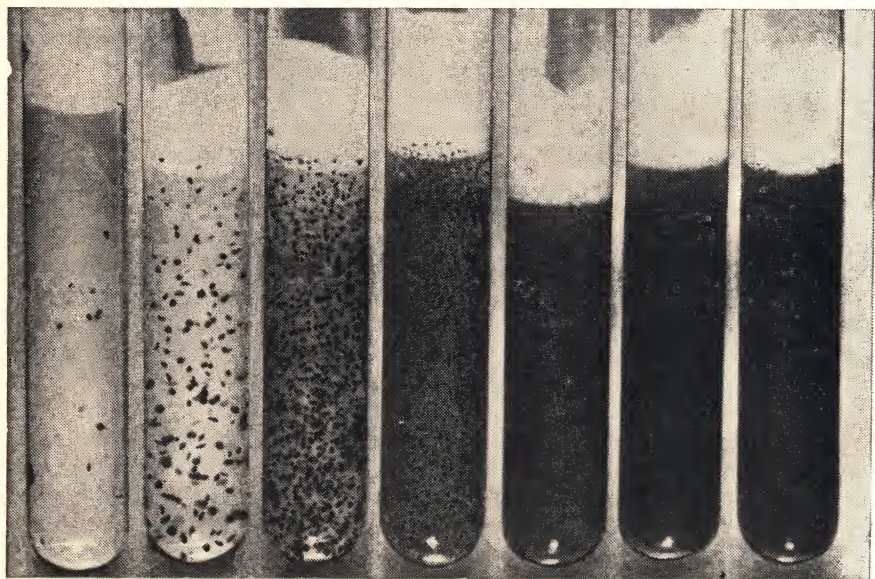


Рис. 2.2. Выделение чистой культуры анаэробных бактерий методом разведения. Показана вся серия пробирок с разведениями. В более плотно

засеянных пробирках (справа) наблюдается сплошной рост, а в двух последних пробирках этой серии разведений (слева) видно хорошо отделенные друг от друга колонии. После того

как агар застыл, каждую пробирку замазали смесью вазелина и парафина, чтобы воспрепятствовать проникновению атмосферного кислорода, подавляющего рост анаэробных бактерий.

оказаться далеко не чистой. Микроорганизмы сильно различаются по своим потребностям, и поэтому не существует единой среды и единого комплекса условий, которые обеспечили бы рост всех имеющихся в природной популяции видов. Вероятно, лишь очень небольшая часть их окажется способной образовывать колонии на каждой данной среде. Поэтому в первой чашке на каждую видимую колонию, возможно, будет приходится тысяча клеток других микроорганизмов, которые тоже были нанесены на поверхность агара, но не дали мак-

роскопически видимого роста, хотя они все еще могут быть жизнеспособными. Весьма вероятно, что некоторые из них также будут захвачены при переносе культуры. Для получения чистой культуры никогда не следует брать пробу с первой чашки. Суспензию клеток, полученную из отдельной колонии в первой чашке, следует рассеять штрихом в новую чашку. Если все колонии в этой второй чашке будут, по всей видимости, идентичными, то хорошо обособленную колонию можно уже будет использовать для получения чистой культуры.

Не все микроорганизмы, способные расти на твердых средах, обязательно образуют отдельные колонии. Некоторые бактерии, движущиеся при помощи жгутиков (например, *Proteus* и *Pseudomonas*), могут быстро распространяться по слегка влажной поверхности свежеразлитой среды в чашке. Этого можно избежать, если использовать среды с хорошо подсушенной поверхностью, по которой клетки передвигаться не могут. Спирохеты и те организмы, которые перемещаются путем скольжения (миксобактерии, цианобактерии¹), могут двигаться по поверхности агарового геля или через него даже в том случае, если поверхность подсушена. Способность подобных организмов к передвижению помогает их очистке, так как они могут сами отделяться от других видов, иммобилизованных на агаре. Благодаря этому часто удается произвести очистку, позволяя клеткам передвигаться и делая повторные пересевы из передней кромки мигрирующей популяции.

Иногда при выделении организмов из природных популяций полезно включать в среду вещества, избирательно подавляющие рост тех или иных микробов. Особенно эффективны некоторые антибиотики ввиду их биологической специфичности. Бактерии сильно различаются по чувствительности к пенициллину; поэтому низкие концентрации его можно использовать для подавления роста пенициллиночувствительных бактерий, присутствующих в исходной популяции. В более высоких концентрациях пенициллин обычно токсичен для прокариотических, но не для эукариотических организмов. Поэтому он очень полезен для очистки культур простейших, грибов и эукариотических водорослей, загрязненных бактериями. Наоборот, прокариоты нечувствительны к полиеновым антибиотикам (например, к нистатину), которые обычно токсичны для эукариот. Добавление таких антибиотиков в среду иногда можно с успехом использовать для очистки бактериальных культур, сильно загрязненных грибами или амебами. Чтобы облегчить выделение микроорганизмов, можно использовать и многие другие вещества, обладающие избирательной токсичностью.

ВЫДЕЛЕНИЕ
ЧИСТЫХ КУЛЬТУР
НА ЖИДКИХ СРЕДАХ

Методы посева на чашки дают обычно удовлетворительные результаты при выделении бактерий и грибов, так как подавляющее большинство этих организмов хорошо растет на твердых средах. Однако пока не удается успешно культивировать на твердых средах некоторые виды бактерий с более крупными клетками; многие простейшие и водоросли также могут расти только в жидкой среде. Хотя в последние годы для выделения вирусов применяются методы посева из чашки, многие вирусы гораздо легче выделить, используя жидкие среды. Конечно, здесь никогда не получают чистой культуры, так как вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты. В этом случае цель заключается в получении двухкомпонентной культуры, состоящей из определенного вируса и его биологического хозяина.

Наиболее простой способ получения чистых культур в жидких средах — это *метод разведений*. Инокулят последовательно разводят стерильной средой и аликвотами из каждого разведения засевают большое число пробирок со средой. Цель этой операции — инокулировать ряд пробирок настолько разведенной взвесью микробов, чтобы вероятность внести в данную пробирку даже одну особь была достаточно малой (порядка 0,05). Если таким разведенным инокулятом засеивается много пробирок, то по теории вероятности можно вычислить, что в 95% всех засеянных пробирок не попадет ни одной клетки. По одной особи попадает в 4,8% пробирок, по две — в 0,12% пробирок, а в 0,002 всех засеянных пробирок окажется по три особи. Поэтому, если в пробирке что-то выросло, то скорее всего этот рост обусловлен попаданием в нее всего лишь одного организма. Вероятность этого составляет

$$\frac{0,048}{0,048 + 0,0012 + 0,00002} = 0,975.$$

Вероятность того, что рост вызван попаданием в пробирку лишь одного организма, очень быстро падает с увеличением среднего числа организмов (клеток) в инокуляте. Поэтому важно, чтобы выделение производилось из той серии пробирок, где в подавляющем большинстве случаев вообще не обнаруживается роста.

Метод разведений, однако, имеет один существенный недостаток. Его можно использовать для выделения только тех организмов, которые *численно преобладают* в смешанной популяции микробов. Им нельзя с успехом пользоваться для выделения более крупных микроорганизмов, неспособных развиваться на твердой среде (например, простейших или водорослей), так как в природных популяциях бактерии, как

правило, сильно превосходят их по численности. Это ограничивает применимость метода разведений.

Если нельзя использовать ни метод разведений, ни метод высева на чашки, то остается только одно — прибегнуть к *контролируемому под микроскопом выделению из смешанной популяции отдельной клетки или организма*. Такая процедура называется *выделением отдельной клетки*. Техническая трудность ее обратно пропорциональна размерам выделяемого организма. Этот метод относительно прост, если микроорганизм обладает крупными клетками, например при работе с водорослями или простейшими, но пользоваться им для выделения бактерий гораздо сложнее.

В случае крупных микроорганизмов нужно захватить отдельный индивидуум в тонкую капиллярную пипетку, а затем промыть его несколько раз в относительно больших объемах стерильной среды, чтобы удалить примесь мелких микробов. Эти операции производят вручную, контролируя их визуально при относительно небольшом увеличении, например используя препаровальную лупу.

Если выделяемый организм столь мал, что его трудно рассмотреть при увеличении менее 100, то применять капилляр уже нельзя, так как при больших увеличениях невозможно достаточно тонко манипулировать им вручную. В этом случае пользуются особым механическим устройством — микроманипулятором — и специально изготовленными очень тонкими стеклянными инструментами. Назначение микроманипулятора состоит в том, чтобы уменьшить амплитуду движений, производимых вручную; это позволяет в небольшом рабочем пространстве (микрокапле) при постоянном наблюдении в микроскоп ($\times 500$ — 1000) осуществлять очень малые и точно контролируемые перемещения инструментов.

ДВУХКОМПОНЕНТНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Обычно цель выделения — получить чистую культуру. Иногда, однако, это сделать невозможно или настолько трудно, что практически не имеет смысла. В этих случаях альтернатива состоит в том, чтобы достичь несколько меньшей степени очистки и получить двухкомпонентную культуру, содержащую всего лишь два вида микроорганизмов. Как уже отмечалось, использование двухкомпонентных культур — единственно возможный метод поддержания вирусов, так как это облигатные паразиты клеточных организмов. Облигатный внутриклеточный паразитизм характерен также для некоторых групп микроорганизмов, обладающих клеточной организацией. Во всех этих случаях двухкомпонентная культура — наилучший достижимый вариант культивирования в контролируемых лабораторных условиях.

Многих простейших, которые в природных условиях питаются более мелкими микроорганизмами, тоже проще всего поддерживать в лаборатории в виде двухкомпонентной культуры вместе с их меньшей по размерам жертвой. Так обстоит дело, например, с инфузориями, амебами и миксомицетами. Такие ассоциации, по-видимому, никогда не бывают *облигатными*, так как тщательное изучение питания некоторых представителей этих групп показало, что их можно выращивать и в чистых культурах. Однако пищевые потребности простейших часто бывают крайне сложными, и поэтому приготовление сред для поддержания их чистых культур — дело трудное и кропотливое. Двухкомпонентные культуры вполне пригодны как для поддержания микроорганизмов, так и для многих экспериментальных целей.

Двухкомпонентную культуру получают в два этапа. Сначала необходимо получить чистую культуру питающего организма (хозяина в случае облигатных внутриклеточных паразитов или жертвы в случае простейших). Затем можно с помощью любого из многочисленных методов (высевая на чашки с твердой средой в присутствии питающего организма, производя разведения в жидкой среде или изолируя отдельные клетки) выделить паразита или хищника и ввести его в чистую культуру питающего организма.

Для успешного поддержания двухкомпонентных культур требуется значительное искусство, так как важно, чтобы сохранялось более или менее устойчивое биологическое равновесие между обоими компонентами. Используемая среда должна обеспечивать рост питающего организма, достаточный для удовлетворения потребностей паразита или хищника, но в то же время не должна быть слишком богатой, иначе развитие питающего организма может подавить рост ассоциированного с ним организма или привести к образованию вредных для него продуктов обмена.

ТЕОРИЯ

И ПРАКТИКА СТЕРИЛИЗАЦИИ

Обработка, в результате которой объект становится свободным от каких-либо живых организмов, называется стерилизацией. Стерилизацию можно производить с помощью губительно действующих (летальных) физических или химических агентов, а растворы можно стерилизовать фильтрованием.

Чтобы были понятны принципы стерилизации при помощи летальных воздействий, необходимо вкратце описать кинетику гибели микробной популяции. В случае микроорганизма единственным обоснованным критерием его гибели служит *необратимая утрата способности к размножению*. Обычно ее оценивают количественно путем посева на чашки с после-

Рис. 2.3. Гибель бактерий происходит по экспоненциальному (логарифмическому) закону. Графики А и Б показывают, как изменяются соответственно величины $\log N$ и N с течением времени (N — число выживших бактерий).

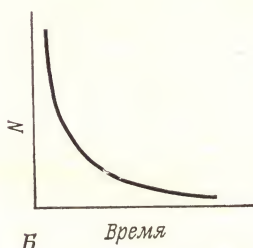
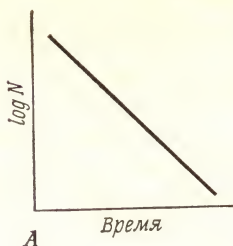
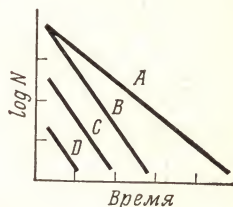


Рис. 2.4. Зависимость времени, необходимого для уничтожения бактериальных культур, от скорости гибели клеток и размера популяции. N — число выживших бактерий. Скорости гибели культур В, С и D одинаковы, а скорость гибели культуры А ниже.



дующим подсчетом выживших организмов (образованных ими колоний). Если действию летального агента подвергается чистая культура микроорганизма, то почти всегда кинетика гибели оказывается *экспоненциальной*: количество выживших организмов уменьшается со временем обработки в геометрической прогрессии. Это отражает тот факт, что все члены популяции обладают одинаковой чувствительностью, так что момент гибели каждого данного организма определяется лишь случайностью. Если откладывать логарифм числа выживших организмов как функцию времени воздействия, получится прямая (рис. 2.3). Наклон этой прямой, взятый с обратным знаком, определяет *скорость гибели*.

Скорость гибели говорит лишь о том, какая *доля* исходной популяции переживет обработку определенной длительности. Чтобы определить, *сколько* организмов может выжить в действительности, нужно знать также величину исходной популяции. Это показано графически на рис. 2.4. Таким образом, при проведении стерилизации нужно учитывать два фактора: скорость гибели и размер исходной популяции.

На практике популяции, подлежащие уничтожению, почти всегда бывают смешанными. Так как микроорганизмы сильно различаются по устойчивости к действию летальных агентов, существенными факторами оказываются размер исходной популяции и скорость гибели *наиболее устойчивых* ее членов. В смешанной популяции почти всегда наиболее устойчивы эндоспоры некоторых бактерий. Поэтому для того, чтобы проверить эффективность методов стерилизации, обычно используют суспензию спор, устойчивость которых известна.

Если учесть кинетику гибели микробов, то можно сформулировать практическую цель стерилизации с помощью летального агента несколько точнее: вероятность того, что стерилизуемый объект после обработки будет содержать хотя бы один выживший организм, должна быть ничтожно малой. Например, если мы хотим простерилизовать 1 л культуральной среды, то для любых практических целей достаточно, если после обработки выживет не более одного организма на 10^6 л среды. Вероятность неудачного исхода в этом случае поистине чрезвычайно мала. Методы стерилизации подбирают таким образом, чтобы всегда обеспечить очень большой запас надежности.

ТЕПЛОВАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Наиболее широко для стерилизации используют тепловую обработку. Предметы можно стерилизовать сухим жаром, прогревая их в печи в атмосфере воздуха, или влажным жаром (т. е. при помощи пара). При стерилизации сухим жаром требуется прогрев гораздо более длительный и до более высоких температур, чем при использовании влажного жара, так как воздух обладает гораздо меньшей теплопроводностью, чем пар. Кроме того, бактерии могут полностью высыхать, а в высушенном состоянии термоустойчивость вегетативных клеток бактерий значительно возрастает и почти достигает уровня, характерного для спор. В результате скорость гибели высохших клеток оказывается сильно сниженной.

Сухой жар используют в основном для стерилизации стеклянной посуды и других термоустойчивых твердых материалов. Предметы заворачивают в бумагу или иным способом защищают от последующего загрязнения и выдерживают в печи при температуре 170°C в течение 90 мин.

Для тепловой стерилизации водных растворов следует использовать пар. Обработку проводят обычно в автоклаве — специальном металлическом сосуде, который может заполняться паром под давлением выше атмосферного. В результате стерилизацию можно проводить при температурах, значительно превышающих температуру кипения воды при нормальном давлении. Обычно используемые в лабораториях автоклавы работают при давлении пара, превышающем атмосферное давление примерно на 1 кг/см^2 , что соответствует температуре 120°C . При такой температуре быстро погибают даже бактериальные споры, которые выдерживают кипячение в течение нескольких часов. Небольшие объемы жидкости (примерно до 3 л) можно простерилизовать таким способом за 20 мин. Для стерилизации больших объемов требуется соответственно более длительная обработка.

44 Температура 120°C внутри автоклава будет достигнута при избыточном давлении 1 кг/см^2 только в том случае, если

атмосфера в автоклаве состоит исключительно из пара. Поэтому сначала удаляют из камеры весь находящийся там воздух, вытесняя его паром. Для этого используют паровой клапан, который оставляют открытым, пока через него выходит воздух, и закрывают, как только автоклав заполнится паром. Если в камере автоклава останется воздух, то парциальное давление пара в ней будет ниже того, которое показывает манометр. Соответственно ниже будет и температура в автоклаве. Поэтому автоклавы всегда снабжают как термометром, так и манометром. Температуру внутри стерилизационной камеры можно также контролировать, помещая в нее вместе со стерилизуемыми предметами специальные индикаторные бумажки, которые изменяют цвет, если прогрев был достаточным.

ХИМИЧЕСКАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Многие вещества, вводимые в состав культуральных сред, слишком термолабильны, и их нельзя стерилизовать в автоклаве. Для работы с такими веществами крайне полезен был бы надежный метод химической стерилизации. Существенное требование, которому должен удовлетворять химический стерилизующий агент, заключается в том, что он должен быть не только *токсичен*, но еще и *летуч*: нужно, чтобы он быстро исчезал из простерилизованного объекта. Наилучшим из доступных веществ такого типа является *окись этилена*. Это жидкость, кипящая при 10,7°C. При температуре от 0 до 4°C окись этилена можно добавлять в растворы в жидком виде (до конечной концентрации примерно 0,5—1,0%), а при температуре выше точки кипения использовать в виде стерилизующего газа. Однако окись этилена химически нестойка и распадается в водных растворах, образуя этиленгликоль, который уже не летуч и может вызывать нежелательные эффекты. Кроме того, она взрывоопасна и токсична для человека, так что при ее использовании необходимо принимать специальные меры предосторожности. Поэтому обычно в лабораторной практике стерилизацию окисью этилена не применяют; однако это вещество используют в промышленности для стерилизации пластмассовых чашек Петри и других предметов, которые плавятся при температурах выше 100°C.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ФИЛЬТРОВАНИЕМ

Для стерилизации растворов термолабильных веществ в лабораториях обычно пропускают их через фильтры, способные задерживать микроорганизмы. Такие фильтры почти всегда обладают комплексным действием. Частично микроорганизмы задерживаются ими потому, что поры фильтра достаточно узки, а частично из-за адсорбции на стенках пор. Адсорб-

ция имеет большое значение, так как фильтр может эффективно задерживать даже такие микроорганизмы, средние размеры которых несколько меньше среднего диаметра пор. Метод стерилизации путем фильтрования имеет один существенный недостаток: так как нижний предел величины вирусных частиц близок к размерам крупных белковых молекул, вирусы вовсе не обязательно задерживаются такими фильтрами, которые не пропускают даже мельчайшие клетки микроорганизмов. Поэтому никогда нельзя быть уверенным, что фильтрование, освобождающее раствор от бактерий, очистит его также и от вирусов.

ПРИНЦИПЫ ПИТАНИЯ МИКРОБОВ

Чтобы расти, организм должен получать из окружающей среды все те вещества, которые необходимы ему для синтеза структурных компонентов клетки и для получения энергии. Поэтому в культуральной среде должны содержаться все эти *питательные вещества* в количествах, соответствующих специфическим потребностям данного микроорганизма. Однако физиология микроорганизмов крайне разнообразна, и поэтому столь же разнообразны их специфические потребности в питательных веществах. Для культивирования микробов предложены буквально тысячи различных сред, и часто при описании этих сред не указывается четко, зачем в них введены те или иные компоненты. Между тем состав культуральной среды может и должен основываться на научных *принципах питания*. Эти принципы и будут рассмотрены в настоящем разделе.

Из химического состава клеток, который в общих чертах одинаков у всех живых организмов, видно, какие вещества должны быть в первую очередь необходимы для их роста. Около 80—90% общей массы клеток составляет вода, поэтому в количественном отношении вода всегда является важнейшим питательным веществом. Кроме *водорода* и *кислорода*, источником которых в процессе метаболизма служит вода, в сухое вещество клеток входят (в порядке убывающих количеств) *углерод*, *азот*, *фосфор* и *сера* (табл. 2.1). На долю этих шести элементов приходится около 95% сухой биомассы клеток, а остаток составляют различные другие элементы. Как показывает изучение питания, почти всем организмам необходимы *калий*, *магний*, *кальций*, *железо*, *марганец*, *кобальт*, *медь*, *молибден* и *цинк*. В таблице 2.2 резюмированы известные функции этих 15 элементов в клетке.

Все необходимые металлы организм может получать в форме *катионов неорганических солей*. Калий, магний, кальций и железо требуются в относительно больших количествах, и поэтому их соли всегда должны включаться в состав

ТАБЛИЦА 2.1

ПРИБЛИЗИТЕЛЬНЫЙ ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ СОСТАВ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ¹⁾

Элемент	Содержание, % от сухого вещества	Элемент	Содержание, % от сухого вещества
Углерод	50	Калий	1
Кислород	20	Натрий	1
Азот	14	Кальций	0,5
Водород	8	Магний	0,5
Фосфор	3	Хлор	0,5
Сера	1	Железо	0,2
		Все остальные элементы	~0,3

¹⁾ Данные для бактерии *Escherichia coli*, приводимые Лурia [S. E. Luria, in: *The Bacteria* (I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, eds.), Vol. 1, Chap. 1 (New York: Academic Press, 1960)].

ТАБЛИЦА 2.2

ГЛАВНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ВАЖНЕЙШИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Элемент	Физиологическая роль
Водород	Входит в состав воды и органического вещества клетки
Кислород	Входит в состав воды и органического вещества клетки; в виде O ₂ служит акцептором электронов при дыхании аэробных организмов
Углерод	Входит в состав органического вещества клетки
Азот	Входит в состав белков, нуклеиновых кислот, коферментов
Сера	Входит в состав белков (в аминокислотах цистеине и метионине) и некоторых коферментов (например, КоА и кокарбоксилазы)
Фосфор	Входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов
Калий	Один из главных неорганических катионов клетки, кофактор для некоторых ферментов
Магний	Важный катион клетки; неорганический кофактор для очень многих ферментативных реакций, в том числе для реакций с участием АТФ; участвует в связывании ферментов с субстратами; входит в состав хлорофиллов
Марганец	Неорганический кофактор для некоторых ферментов; иногда может заменять магний
Кальций	Важный катион клетки; кофактор для некоторых ферментов (например, протеиназ)
Железо	Входит в состав цитохромов и других белков, содержащих или не содержащих гем; кофактор для некоторых ферментов
Кобальт	Входит в состав витамина В ₁₂ и его производных, служащих коферментами
Медь, цинк, молибден	Неорганические компоненты некоторых ферментов

культуральных сред. Нужные количества марганца, кобальта, меди, молибдена и цинка очень малы; часто даже бывает трудно доказать, что эти элементы действительно необходимы, так как они присутствуют в достаточных количествах в виде примесей к основным неорганическим компонентам среды. Поэтому их часто называют *микроэлементами* или *следовыми элементами*. Один из неметаллов, фосфор, также можно добавлять в среду в неорганической форме — в виде фосфатов.

Следует отметить, что у некоторых групп микроорганизмов имеются дополнительные, специфические потребности в минеральных веществах. Например, клеточные стенки диатомовых и некоторых других водорослей сильно насыщены кремнием, и эти организмы нуждаются в кремнии, который добавляют в среду в виде силиката. Хотя у большинства микроорганизмов не удастся выявить потребность в натрии, некоторым морским и фотосинтезирующим бактериям (в частности, цианобактериям) он необходим в относительно высоких концентрациях. В этих случаях его нельзя заменить другими одновалентными катионами.

Потребности в *углероде, азоте, сере и кислороде* нельзя охарактеризовать так же просто, поскольку определенные группы организмов должны получать эти элементы в определенной химической форме.

ПОТРЕБНОСТЬ В УГЛЕРОДЕ

Фотосинтезирующие организмы и те бактерии, которые получают энергию в результате окисления неорганических соединений, используют обычно в качестве единственного или главного источника углерода CO_2 — вещество, содержащее углерод в наиболее окисленной форме. Превращение CO_2 в органические компоненты клетки — восстановительный процесс, требующий затраты энергии. Соответственно у этих физиологических групп микроорганизмов значительная часть энергии, получаемой от света или при окислении восстановленных неорганических соединений, должна затрачиваться на восстановление CO_2 до уровня органических веществ.

Все другие организмы получают углерод в основном из органических питательных веществ. Большинство органических субстратов окислено до того же уровня, что и органические компоненты клетки. Поэтому для того, чтобы они могли служить источниками клеточного углерода, обычно не требуется их предварительного восстановления. Но органические субстраты используются не только для целей биосинтеза; они должны также удовлетворять энергетические потребности клетки. Поэтому значительная часть углерода, содержащегося в органическом субстрате, направляется по тем путям ме-

таболизма, которые доставляют энергию, и в конце концов выводится из клетки в виде CO_2 (основного продукта аэробного обмена) или в виде смеси CO_2 и органических соединений (типичных конечных продуктов брожения). Таким образом, органические питательные вещества обычно играют двойную роль: они служат одновременно и источниками углерода, и источниками энергии. Многие микроорганизмы могут полностью удовлетворять свои потребности в углеводе каким-нибудь одним органическим соединением. Другие, однако, не способны расти в присутствии лишь одного органического соединения и нуждаются в различных добавочных органических веществах. Эти добавочные вещества нужны исключительно для целей биосинтеза и используются в качестве предшественников определенных органических компонентов клетки, которые организм не может полностью синтезировать сам. Они называются ростовыми факторами, и роль их будет более подробно рассмотрена ниже.

Микроорганизмы крайне разнообразны в отношении как типа, так и числа тех органических соединений, которые они могут использовать в качестве основных источников углерода и энергии. Разнообразие это так велико, что *любое природное органическое соединение может использоваться каким-нибудь микроорганизмом*. Поэтому кратко описать химическую природу органических источников углерода для микроорганизмов невозможно. Это необычайное разнообразие потребностей в углеводе — один из интереснейших аспектов физиологии микробов.

При изучении потребностей в органических соединениях у отдельных микроорганизмов оказывается, что некоторые из них крайне «многоядны», тогда как другие отличаются высокой специализацией. Например, некоторые бактерии группы *Pseudomonas* способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии более 90 различных органических соединений (табл. 2.3). На другом конце спектра находятся бактерии, окисляющие метан, которые могут использовать только два органических субстрата — метан и метанол, а также некоторые бактерии, способные расщеплять целлюлозу и использующие только этот субстрат.

Большинство организмов, которые зависят от органических источников углерода (а возможно, и все они), нуждаются также в очень небольших количествах CO_2 , так как это соединение необходимо для некоторых биосинтетических реакций. Но так как обычно организмы, использующие органический субстрат, образуют в больших количествах углекислоту, потребность в ней для целей биосинтеза может быть удовлетворена за счет этого источника. Тем не менее полное удаление CO_2 из среды часто задерживает, а иногда и полностью подавляет рост микроорганизмов на органических средах, а для того, чтобы на таких средах удовлетворительно

ТАБЛИЦА 2.3

ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, КОТОРЫЕ МОГУТ СЛУЖИТЬ ЕДИНСТВЕННЫМ ИСТОЧНИКОМ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ ДЛЯ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS CERATIA*

1. Углеводы и их производные (сахарные кислоты и сахароспирты):

Рибоза	Салицин
Ксилоза	Глюконовая кислота
Арабиноза	2-кетоглюконовая кислота
Фукоза	Сахарная кислота
Рамноза	Слизевая кислота
Глюкоза	Маннит
Манноза	Сорбит
Галактоза	Инозит
Фруктоза	Адонит
Сахароза	Глицерин
Трегалоза	Бутиленгликоль
Целлобиоза	

2. Жирные кислоты:

Уксусная	Капроновая
Пропионовая	Энантовая
Масляная	Каприловая
Изомасляная	Пеларгоновая
Валериановая	Каприновая
Изовалериановая	

3. Дикарбоновые кислоты:

Малоновая	Адипиновая
Янтарная	Пимелиновая
Фумаровая	Субериновая
Глутаровая	Азелаиновая
Себациновая	

4. Другие органические кислоты

Лимонная	Яблочная
α -Кетоглутаровая	Винная
Пировиноградная	Оксимасляная
Аконитовая	Молочная
Цитраконовая	Глицериновая
Левулиновая	Оксиметилглутаровая
Гликолевая	

5. Первичные спирты:

Этанол	Бутанол
Пропанол	

6. Аминокислоты:

Аланин	Гистидин
Серин	Пролин
Треонин	Тирозин
Аспарагиновая кислота	Фенилаланин
Глутаминовая кислота	Триптофан
Лизин	Кинуренин
Аргинин	Кинуреновая кислота

7. Другие азотсодержащие соединения:

Антрилат	Бетанин
Бензиламин	Саркозин
Путресцин	Гиппуровая кислота
Спермин	Ацетамид
Триптамин	Никотиновая кислота
Бутиламин	Тригонеллин
Амиламин	

8. Безазотистые ароматические соединения:

Бензоилмуравьиная кислота	Фенилуксусная кислота
Бензойная кислота	Фенол
о-Оксибензойная кислота	Хинная кислота
м-Оксибензойная кислота	Тестостерон
п-Оксибензойная кислота	

росли некоторые бактерии и грибы, нужны относительно высокие концентрации CO_2 в атмосфере (5—10%).

ПОТРЕБНОСТЬ В АЗОТЕ И СЕРЕ

Азот и сера входят в состав органических веществ клетки главным образом в восстановленной форме, т. е. соответственно в виде аминогрупп и сульфгидрильных групп. Большинство фотосинтезирующих организмов поглощает эти два элемента в окисленном состоянии — в форме неорганических солей (нитратов и сульфатов). Поэтому они сначала восстанавливаются, а затем уже используются в биосинтезах. Многие нефотосинтезирующие бактерии и грибы также могут удовлетворять свои потребности в азоте и сере за счет нитратов и сульфатов. Некоторые микроорганизмы неспособны восстанавливать азот и (или) серу соответствующих анионов, и эти элементы необходимы им *в восстановленной форме*. Потребность в восстановленном азоте распространена довольно широко; в этих случаях можно давать азот в виде солей аммония. Потребность в восстановленной сере встречается реже; источником такой серы могут служить сульфиды или какие-нибудь органические соединения, содержащие сульфгидрильные группы (например, цистеин).

Потребность в азоте и сере часто может быть удовлетворена за счет органических веществ, содержащих N и S в восстановленной форме (аминокислот или более сложных продуктов распада белка, например пептонов). Такие соединения нередко могут служить также источниками энергии и углерода; в этом случае они сразу удовлетворяют потребность клетки и в углероде, и в азоте, и в сере, и в энергии.

Некоторые бактерии могут использовать N_2 — самый обильный источник азота в природе. Этот процесс называется *фиксацией азота*, и первая его стадия состоит в восстановлении N_2 до аммиака.

ФАКТОРЫ РОСТА

Любое органическое соединение, которое необходимо организму в качестве предшественника или составной части органического материала клетки, но которое сам он не может синтезировать из более простых источников углерода, должно быть обеспечено в питании. Такого рода органические питательные вещества называют *факторами роста*. По своей химической структуре и по своей роли в метаболизме эти вещества делятся на три класса:

1) аминокислоты, которые нужны для построения белков;
2) пурины и пиримидины, необходимые для построения нуклеиновых кислот;

3) витамины, к которым относятся самые различные органические соединения. Витамины входят в состав простетических групп или активных центров некоторых ферментов (табл. 2.4).

ТАБЛИЦА 2.4

СВЯЗЬ НЕКОТОРЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ С КОФЕРМЕНТАМИ

Витамин	Кофермент	Ферментативные реакции, протекающие с участием кофермента
Никотиновая кислота (ниацин)	Пиридиннуклеотидные коферменты (НАД и НАДФ)	Дегидрирование
Рибофлавин (витамин В ₂)	Флавиннуклеотиды (ФАД и ФМН)	Некоторые реакции дегидрирования, перенос электронов
Тиамин (витамин В ₁)	Тиаминпирофосфат (ко-карбоксилаза)	Декарбоксилирование, перенос некоторых групп
Пиридоксин (витамин В ₆)	Пиридоксальфосфат	Обмен аминокислот, трансаминирование, деаминация, декарбоксилирование
Пантотеновая кислота	Кофермент А	Окисление кетокислот, обмен жирных кислот
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолиевая кислота	Перенос одноуглеродных единиц
Биотин	Простетическая группа биотиновых ферментов	Фиксация СО ₂ , перенос карбоксильной группы
Кобамид (витамин В ₁₂)	Кобамидные коферменты	Внутримолекулярные перестройки

Так как ростовые факторы удовлетворяют лишь специфические потребности, связанные с процессами биосинтеза, они нужны лишь в небольших количествах по сравнению с главным источником углерода — основным предшественником органических веществ клетки. В состав белков входит примерно 20 различных аминокислот, так что потребность в любой отдельной аминокислоте, которую клетка сама не может синтезировать, не слишком велика. Это относится и к потреб-

ности в каком-либо пурине или пиримидине, поскольку в состав нуклеиновых кислот входят пять различных соединений такого типа. Витамины нужны в еще меньших количествах, так как различные коферменты, для которых они служат предшественниками, выполняют каталитические функции и потому их содержание в клетке измеряется миллионными долями сухого вещества клетки (табл. 2.5).

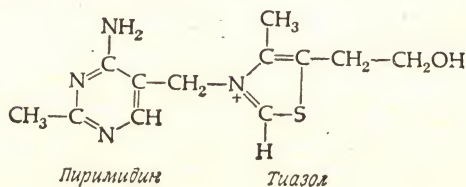
ТАБЛИЦА 2.5

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ¹⁾ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ (R. C. THOMPSON, TEXAS UNIV. PUBL. 4237, 87, 1942)

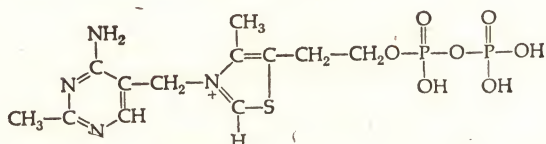
Витамин	Содержание, миллионные доли веса сухого вещества клетки		
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
Никотиновая кислота	240	210	250
Рибофлавин	44	67	55
Тиамин	11	26	9
Пиридоксин	7	6	6
Пантотеновая кислота	140	91	93
Фолиевая кислота	14	9	3
Биотин	4	7	Необходим для роста

¹⁾ В клетке эти вещества находятся в виде коферментов. Однако в таблице приведены данные для соответствующих витаминов, в которые эти коферменты превращаются после экстракции и в такой форме подвергаются количественному анализу.

Биосинтез аминокислот, пуринов, пиримидинов и коферментов включает обычно сложные цепи отдельных реакций, которые будут рассмотрены в гл. 7. Если организм неспособен осуществить *хотя бы одну* из этих реакций, то он должен получать ее конечный продукт извне в виде фактора роста. Однако организму не всегда необходим этот фактор в готовом виде. Если блокирован один из ранних этапов в цепи биосинтеза, то специфическую потребность клетки можно удовлетворить теми органическими предшественниками, которые образуются в этой цепи *после* блокированного участка. Подробный анализ потребности различных микроорганизмов в каком-нибудь факторе обычно показывает, что они нуждаются в разных химических формах данного фактора. В качестве примера можно привести довольно широко распространенную потребность в витамине В₁ (тиамине), имеющей следующую структуру:



Некоторым микроорганизмам в качестве фактора роста нужна непременно вся эта молекула. Однако есть и такие организмы, которым можно давать две половинки этой молекулы по отдельности: они сами способны соединять их. Другие микроорганизмы нуждаются лишь в пиримидиновой части молекулы, так как могут синтезировать тиазольную часть самостоятельно. Наконец, встречаются и такие, которым необходима лишь тиазольная часть молекулы, поскольку они сами могут синтезировать пиримидиновую часть и соединять ее с тиазолом. Эти группы организмов различаются по *минимальной* потребности в факторе роста, но в любом случае клетка должна в конце концов иметь целую молекулу тиамина; поэтому тиамин можно давать в качестве фактора роста микроорганизмам любого описанного выше типа. Однако даже целая молекула тиамина — это еще не то соединение, которое организм использует непосредственно как необходимый клеточный компонент. Таким функционирующим в клетке веществом является кофермент кокарбоксилаза, который участвует в качестве простетической группы в ряде ферментативных реакций. Этот кофермент представляет собой тиаминпирозин и имеет следующую структуру:



РОЛЬ КИСЛОРОДА В ПИТАНИИ

Кислород входит в состав воды и органических соединений клетки. Таким образом, он содержится во всех клетках и, будучи компонентом воды, всегда поступает извне в больших количествах. Однако многие организмы нуждаются и в *молекулярном кислороде* O_2 . К ним относятся те виды, которые удовлетворяют свою потребность в энергии за счет аэробного дыхания и у которых молекулярный кислород играет роль терминального окислителя. Такие организмы называют *облигатными аэробами*.

На другом физиологическом полюсе находятся те микроорганизмы, которые получают энергию в результате реакций, не включающих использование молекулярного кислорода, и для которых кислород в такой химической форме питательным веществом не является. Более того, для многих групп с такой физиологией молекулярный кислород токсичен — он убивает подобные микроорганизмы или же подавляет их рост. Такие организмы называют *облигатными анаэробами*.

Среди микроорганизмов есть также *факультативные анаэробы*, способные расти и в присутствии, и в отсутствие мо-

лекулярного кислорода. По своему метаболизму факультативные анаэробы делятся на две подгруппы. Некоторые из них, например молочнокислые бактерии, получают энергию исключительно в результате брожения, но нечувствительны к присутствию кислорода. У других (например, у многих дрожжей и у энтеробактерий) метаболизм может переключаться с дыхания на брожение. Когда имеется O_2 , они используют его для терминального окисления, но в отсутствие кислорода могут получать энергию также и с помощью брожения.

Некоторые из облигатных аэробов лучше растут при парциальных давлениях кислорода, значительно меньших, чем в воздухе (0,2 атм). Такие микроорганизмы называются *микроаэрофильными*. Возможно, что у них имеются ферменты, которые инактивируются в среде с сильными окислительными свойствами и потому могут действовать только при низких парциальных давлениях O_2 . Таковы многие бактерии, получающие энергию в результате окисления молекулярного водорода; известно, что гидрогеназа — фермент, участвующий в использовании водорода, — легко инактивируется кислородом.

РАЗДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГРУППЫ ПО ТИПАМ ПИТАНИЯ

Первоначально биологи подразделяли организмы по способу питания на два основных типа — на *автотрофов* (например, растения), которые могут полностью обходиться неорганическими питательными веществами, и *гетеротрофов* (например, животные), которые нуждаются в органической пище. Сейчас этих двух простых категорий оказывается уже недостаточно, чтобы отразить все многообразие известных нам пищевых потребностей живых организмов, и было сделано много попыток создать более сложные системы классификации. По-видимому, наиболее полезна, хотя и относительно проста, классификация, основанная на двух параметрах — природе источника энергии и природе основного источника углерода. По источнику энергии все организмы делятся на два типа: фотосинтезирующие организмы, способные использовать энергию света и называемые *фототрофами*, и те организмы, которые нуждаются в химических источниках энергии и которые называют *хемотрофами*. Организмы, способные использовать в качестве главного источника углерода CO_2 , называют *автотрофами*, а те, которым нужны органические источники углерода, — *гетеротрофами*. На основе этих критериев можно разделить все организмы по типу питания на четыре главные категории:

- 55 1. *Фотоавтотрофы* — используют свет как источник энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода. Эта кате-

гория включает большинство фотосинтезирующих организмов: высшие растения, водоросли и многие фотосинтезирующие бактерии.

2. *Фотогетеротрофы* — используют свет в качестве источника энергии и какое-нибудь органическое вещество как основной источник углерода. Сюда относятся некоторые пурпурные и зеленые бактерии.
3. *Хемоавтотрофы* — используют химический источник энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода. Они получают энергию в результате окисления таких *восстановленных неорганических веществ*, как NH_3 , NO_2^- , H_2 , восстановленные формы серы (H_2S , S , S_2O_3) или закисное железо. В эту группу входят только представители бактерий. Так как эти организмы способны расти в чисто минеральной среде без света, их называют иногда *хемолитотрофами* (от греческого lithos — камень).
4. *Хемогетеротрофы* — используют химический источник энергии и органическое вещество в качестве основного источника углерода. Характерное для трех предыдущих категорий различие между источником энергии и источником углерода в случае хемогетеротрофов утрачивает четкость, так как здесь *и углерод, и энергия* обычно могут быть результатом метаболизма одного и того же органического соединения. К хемогетеротрофам относятся все многоклеточные животные, простейшие, грибы и подавляющее большинство бактерий. Внутри этой очень сложной группы возможны дальнейшие подразделения. Одно из них основано на том, в каком физическом состоянии органический материал проникает внутрь клетки. *Осммотрофы* (например, бактерии и грибы) получают все питательные вещества в растворенном виде, а *фаготрофы* (например, простейшие) могут поглощать твердые частицы пищи путем *фагоцитоза* (см. стр. 105).

Следует подчеркнуть, что ввиду значительной «гибкости» многих микроорганизмов в отношении питания классификация их по этому признаку оказывается в известной степени произвольной. Например, многие фотоавтотрофные водоросли могут также расти в темноте как хемогетеротрофы. Некоторые фотогетеротрофы и хемоавтотрофы могут питаться и как хемогетеротрофы. Такие организмы относят обычно к категории с более простыми потребностями: например, фототрофность имеет в этом смысле преимущество перед хемотрофностью, а автотрофность — перед гетеротрофностью. Чтобы указать, что организм может (или не может) переключаться на иной тип питания, часто употребляют термины *облигатный* или *факультативный*. Например, *облигатному фотоавтотрофу* обязательно нужен свет для получения энергии и CO_2 в качестве основного источника углерода, тогда

как *факультативный фотоавтотроф* располагает и другими возможностями.

Для указания потребности в факторах роста иногда используют два дополнительных термина — *прототрофность* и *ауксотрофность*. Прототрофы могут удовлетворять все свои потребности в углероде за счет основного его источника. Ауксотроф же нуждается, кроме того, еще в одном или нескольких органических веществах (факторах роста). Как прототрофы, так и ауксотрофы могут встречаться среди организмов любой из четырех главных категорий, выделенных по признаку источника энергии и основного источника углерода. Например, для многих фотоавтотрофных водорослей и бактерий характерна ауксотрофность, которая выражается в том, что им абсолютно необходим какой-нибудь витамин или же несколько витаминов.

ПОДБОР СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕД

Главная цель при подборе среды для выращивания любого микроорганизма состоит в том, чтобы создать сбалансированную смесь необходимых питательных веществ в таких концентрациях, при которых рост будет наилучшим. На первый взгляд может показаться, что нужно просто сделать среду как можно более богатой, добавив в нее все вещества в большом избытке. Однако это было бы неразумно. Во-первых, в повышенных количествах многие питательные вещества начинают подавлять рост или оказываются токсичными. При достаточно высоких концентрациях подобный эффект дают такие органические субстраты, как соли жирных кислот (например, уксусной кислоты) и даже сахара. Подавлять рост могут и некоторые неорганические компоненты, если они окажутся в избытке; например, многие водоросли очень чувствительны к концентрации неорганического фосфата в среде. Во-вторых, даже если микроорганизм и может расти в среде с высоким содержанием питательных веществ, то в результате метаболической активности растущей популяции среда в конце концов настолько изменится, что условия будут весьма неблагоприятными и популяция станет физиологически аномальной или просто погибнет. Это может быть обусловлено сильным изменением pH, накоплением токсичных органических метаболитов, а в случае строгих аэробов — истощением запасов кислорода. Так как обычно задача микробиолога состоит в изучении микроорганизмов, находящихся в нормальном состоянии, разумно ограничить общий рост культуры, вводя одно из питательных веществ в лимитирующем количестве; в случае хемотрофов для этой цели обычно используют основной источник углерода. В приводимых

ниже прописях различных сред будут приведены надлежащие концентрации питательных веществ.

При приготовлении сред целесообразно составить сначала их *минеральную основу*, содержащую все те питательные вещества, которые можно дать любому организму в неорганической форме. Затем в эту основную среду можно ввести нужные добавки — источник углерода, источник энергии, источник азота и необходимые ростовые факторы. Состав этих добавок, естественно, зависит от потребностей выращиваемого организма. Среда, в которую входят только определенные химические соединения, называется *синтетической*. Если же среда содержит и такие ингредиенты, химический состав которых известен лишь частично, то ее называют сложной.

Эти принципы можно проиллюстрировать на примере четырех сред возрастающей сложности, каждая из которых подходит для культивирования определенных видов хемотрофных бактерий (табл. 2.6). Все четыре среды имеют одну и ту же минеральную основу. В среду 1 введен NH_4Cl в концентрации 1 г/л, но она не содержит источника углерода. Однако при инкубации в аэробных условиях источником углерода может служить углекислота, поступающая из воздуха. В темноте на такой среде могут расти только хемоавтотрофные нитрифицирующие бактерии, например *Nitrosomonas*, которые используют углерод из CO_2 , а энергию получают в результате аэробного окисления NH_4Cl , который служит также источником азота.

ТАБЛИЦА 2.6

ЧЕТЫРЕ СРЕДЫ ВОЗРАСТАЮЩЕЙ СЛОЖНОСТИ

Общие компоненты	Дополнительные компоненты			
	Среда 1	Среда 2	Среда 3	Среда 4
Вода, 1 л	NH_4Cl , 1 г	Глюкоза ¹⁾ , 5 г	Глюкоза, 5 г	Глюкоза, 5 г
K_2HPO_4 , 1 л		NH_4Cl , 1 г	NH_4Cl , 1 г	Дрожжевой экстракт, 5 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 мг			Никотиновая кислота 0,1 мг	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 мг				
CaCl_2 , 10 мг				
Микроэлементы (Мп, Мо, Си, Со, Zn) в виде неорганиче- ских солей, по 0,02—0,5 мг каж- дого				

¹⁾ Если среда стерилизуется в автоклаве, то глюкозу нужно стерилизовать отдельно и затем стерильно добавлять в среду. При нагревании в присутствии других ингредиентов среды, особенно фосфатов, сахара частично разлагаются и образуют вещества, весьма токсичные для некоторых микроорганизмов.

В среду 2 дополнительно введена глюкоза в концентрации 5 г/л. В аэробных условиях на такой среде способны расти многие бактерии и грибы, так как глюкоза обычно может использоваться и как источник углерода, и как источник энергии при аэробном росте. При инкубации в отсутствие кислорода на такой среде могут развиваться многие факультативные или строгие анаэробы, которые способны получать углерод и энергию при сбраживании глюкозы. Отметим, однако, что эта среда не подходит для микроорганизмов, нуждающихся в факторах роста, так как в нее входит лишь одно-единственное углеродсодержащее соединение.

В среду 3 добавлен дополнительно один витамин — никотиновая кислота. Поэтому в ней могут расти все организмы, способные развиваться в среде 2, и, кроме того, бактерии, которым нужна в качестве фактора роста никотиновая кислота, например *Proteus vulgaris*.

Химическая природа всех веществ, входящих в состав сред 1—3, известна, т. е. это синтетические среды. Среда 4 является уже сложной средой, в которой NH_4Cl и никотиновая кислота, входящие в среду 3, заменены дрожжевым экстрактом (в концентрации 5 г/л), состав которого точно не известен. В такой среде могут расти многие гетеротрофные микроорганизмы — аэробы и анаэробы, как вовсе не нуждающиеся в факторах роста или нуждающиеся в относительно простых факторах, так и те, потребности которых очень сложны. Дрожжевой экстракт содержит множество органических азотсодержащих соединений (продуктов неполного расщепления белков), способных удовлетворить общие потребности растущих клеток в азоте, и большинство органических факторов роста, которые могут быть необходимы микроорганизмам.

Таким образом, сложные среды пригодны для культивирования самых разных видов, в том числе и таких, потребность которых в факторах роста не изучена полностью. Даже если потребность микроорганизма в этих факторах точно известна, часто бывает удобнее выращивать его на сложной среде, особенно если он нуждается сразу во многих факторах роста. В качестве примера можно привести синтетическую среду (табл. 2.7), способную поддерживать рост молочнокислой бактерии *Leuconostoc mesenteroides*. Эту бактерию можно успешно выращивать и на среде 4; в этом случае входящий в среду 4 дрожжевой экстракт удовлетворяет потребность бактерии в уксусной кислоте, 19 аминокислотах, 4 пуринах и пиримидинах и 10 витаминах.

Среды, представленные в табл. 2.6, могут поддерживать развитие микроорганизмов только в том случае, если будет соблюден также ряд дополнительных условий. Для роста необходимы подходящая температура инкубации и благоприятные осмотические условия; кроме того, нужно, чтобы концент-

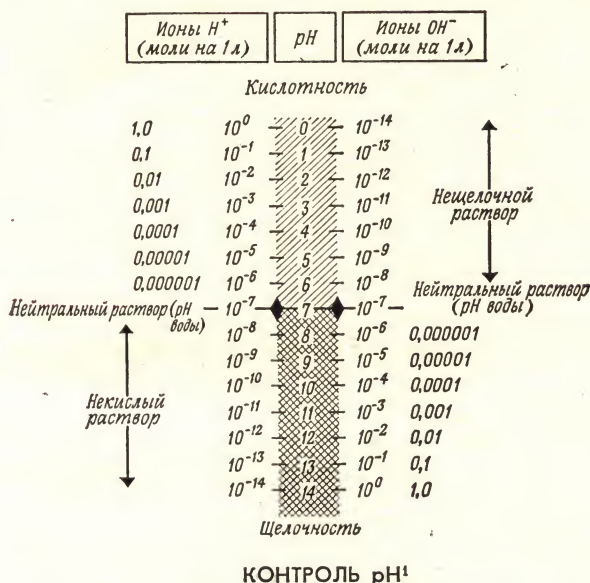
ТАБЛИЦА 2.7
СРЕДА ДЛЯ *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*¹⁾

Компонент	Количество, мг (если не указана иная единица)	Компонент	Количество, мг
Вода	1 л		
Источник энергии:			
Глюкоза	25 г		
Источник азота:			
NH ₄ Cl	3 г		
Минеральные соли:			
KH ₂ PO ₄	600	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
K ₂ HPO ₄	600	MnSO ₄ ·4H ₂ O	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	NaCl	10
Органическая кислота:			
Уксуснокислый натрий	20 г		
Аминокислоты:			
DL-α-аланин	200	L-лизин·HCl	250
L-аргинин	242	DL-метионин	100
L-аспарагин	400	DL-фенилаланин	100
L-аспарагиновая кис- лота	100	L-пролин	100
L-цистеин	50	DL-серин	50
L-глутаминовая кис- лота	300	DL-треонин	200
Глицин	100	DL-триптофан	40
L-гистидин·HCl	62 мг	L-тирозин	100
DL-изолейцин	250	DL-валин	250
DL-лейцин	250		
Пурины и пиримидины:			
Аденинсульфат·H ₂ O	10	Урацил	10
Гуанин·HCl·2H ₂ O	10	Ксантин·HCl	10
Витамины:			
Тиамин·HCl	0,5	Рибофлавин	0,5
Пиридоксин·HCl	1,0	Никотиновая кислота	1,0
Пиридоксамин·HCl	0,3	n-Аминобензойная кис- лота	0,1
Пиридоксаль·HCl	0,3	Биотин	0,001
Пантотенат кальция	0,5	Фолиевая кислота	0,01

¹⁾ H. E. Sauberlich a. C. A. Baumann, A factor required for the growth of *Leuconostoc citrovorum*, J. Biol. Chem., 176, 166 (1948).

рация водородных ионов в среде была подходящей для данного организма. Чтобы привести осмотические условия и pH среды в соответствие с потребностями микроорганизмов, для которых среда вполне пригодна по составу питательных веществ, иногда приходится вводить в нее химические добавки.

диссоциированной кислоты или основания соответственно.



Даже если какая-то среда благоприятна для начального этапа роста, не исключено, что в результате химических изменений, вызванных метаболизмом самих бактериальных клеток, дальнейшее развитие популяции в этой среде прекратится. Например, в средах, содержащих глюкозу, в результате брожения могут накапливаться органические кислоты, которые будут подавлять рост бактерий.

С другой стороны, использование или распад анионных компонентов среды в результате деятельности микробов может привести к подщелачиванию среды. Например, окисление молекулы сукцината натрия ведет к образованию двух молекул карбоната натрия — соли с выраженными щелочными свойствами. При расщеплении белков и аминокислот также может происходить подщелачивание среды в результате образования аммиака.

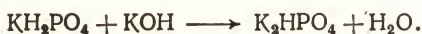
Чтобы не допустить чрезмерных изменений концентрации водородных ионов, в среду часто добавляют *буферы* или *нерастворимые карбонаты*.

¹ Биологи и биохимики почти всегда пользуются для оценки концентрации водородных ионов в водных растворах показателем рН (рис. 2.5). Этот показатель равен логарифму величины, обратной концентрации водородных ионов (в молях на литр), т. е. $\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]}$. Например, рН раствора кислоты, в котором концентрация водородных ионов равна 0,1 н., составляет 1,0, так как $\log (1/0,1) = \log 10 = 1,0$.

Чаще всего используют фосфатные буферы, состоящие из смеси однозамещенного и двузамещенного фосфатов (K_2HPO_4 и KH_2PO_4). Первая из этих солей слабокислая, а вторая — слабоосновная, так что если в растворе они содержатся в эквимольных количествах, то такой раствор будет приблизительно нейтральным (рН 6,8). Если к нему будет добавлено небольшое количество сильной кислоты, то часть слабоосновной соли превратится в слабокислую:



если же будет добавлено сильное основание, то произойдет обратный процесс:

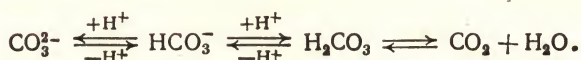


Таким образом, раствор действует как буфер и при образовании в среде кислоты или основания препятствует сильному изменению рН. Используя кислый и основной фосфаты в разных соотношениях, можно установить в среде любую величину рН в пределах примерно от 6,0 до 7,6. Однако хорошая буферность достигается лишь в более узких пределах, примерно от рН 6,4 до 7,2, так как емкость буферного раствора ограничена содержащимися в нем количествами основной и кислой соли. Поэтому чем кислее исходный буфер, тем слабее он может препятствовать увеличению концентрации водородных ионов (т. е. снижению рН) и тем выше его способность реагировать с основаниями. И наоборот, чем больше щелочность буфера, тем в меньшей степени он может предотвращать увеличение рН и тем выше его способность препятствовать закислению среды.

Фосфаты широко используются при приготовлении сред, так как это единственные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне около нейтрального значения рН, и так как они малотоксичны для микроорганизмов; кроме того, они служат источником фосфора — одного из элементов, необходимых для роста. В высоких концентрациях фосфаты начинают подавлять рост культуры; поэтому толерантность данного микроорганизма ставит предел количеству фосфатного буфера, которое можно использовать в среде. Как правило, бактерии и грибы могут выдерживать до 5 г фосфатов калия на 1 л среды.

Если культура интенсивно продуцирует кислоту, то тех ограниченных количеств фосфатного буфера, которые можно добавлять в среду, оказывается недостаточно для поддержания нужного рН. В таких случаях в среду в качестве «резервной щелочи» для нейтрализации кислот по мере их образования можно добавлять карбонаты. В присутствии ионов водорода карбонат превращается в бикарбонат, а бикарбонат — в угольную кислоту, которая спонтанно распадается

на CO_2 и воду. Эту цепь обратимых реакций можно записать так:



Так как H_2CO_3 — кислота чрезвычайно слабая и так как образующаяся при ее распаде CO_2 уходит в атмосферу, добавление в среду карбонатов предотвращает накопление в ней ионов, а значит и свободных кислот. Такие растворимые карбонаты, как Na_2CO_3 , будучи сильноосновными, не подходят для культуральных сред. Наоборот, *нерастворимые карбонаты* используются для приготовления многих сред. Чаше всего добавляют тонко измельченный мел (CaCO_3). Так как углекислый кальций нерастворим, он не вызывает сильного подщелачивания среды, особенно в сочетании с другими буферами. Когда pH раствора падает ниже 7,0, этот карбонат распадается с образованием CO_2 . Таким образом он нейтрализует любые кислоты, которые могут появиться в культуре, переводя их в кальциевые соли.

Добавление CaCO_3 к агаризованным средам, используемым для выделения и выращивания бактерий, продуцирующих кислоты, помогает поддерживать нейтральную реакцию среды. Кроме того, выделяющие кислоту колонии растворяют частицы мела и образуют вокруг себя прозрачные зоны, что делает их легко видимыми на непрозрачном фоне.

В некоторых случаях для поддержания относительно постоянного pH в культуральной среде нельзя использовать ни буферы, ни нерастворимые карбонаты. Особая трудность возникает, например, если в среде в очень больших количествах образуются кислоты, а добавлять углекислый кальций нельзя. Еще большие затруднения встречаются, когда нужно поддерживать pH в слабощелочных средах, в которых рост бактерий приводит к образованию веществ с основными свойствами. Дело в том, что в области pH от 7,2 до 8,5 фосфатные буферы неэффективны, а других подходящих буферов для этого диапазона pH не существует. Поэтому иногда приходится периодически или непрерывно доводить pH культуры до нужной величины, стерильно добавляя в среду сильную щелочь или кислоту. В некоторых лабораториях и на производстве для этой цели используют сложные механические устройства, с помощью которых можно непрерывно производить титрование среды и поддерживать приблизительно постоянное значение pH.

Все среды, приведенные в табл. 2.6, вначале имеют слабощелочную реакцию, так как содержат основную соль K_2HPO_4 . Многие организмы лучше развиваются в нейтральных или слабокислых условиях, которые можно создать с помощью подходящих буферов.

МЕРЫ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩИЕ ВЫПАДЕНИЕ ОСАДКА МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ.

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ АГЕНТОВ

Приготавливая синтетические среды, микробиологи нередко сталкиваются с тем, что в процессе стерилизации выпадает осадок. Особенно часто это происходит, если среда содержит относительно высокие концентрации фосфатов. Осадок выпадает из-за того, что образуются нерастворимые комплексы фосфатов с некоторыми катионами, особенно с кальцием и железом. Обычно это не сказывается на питательной ценности среды, но осадок может затруднить наблюдение за развитием микробов или количественную оценку их роста. Образование осадка можно избежать, если отдельно стерилизовать концентрированные растворы солей кальция и железа, а затем добавлять их к уже простерилизованной и охлажденной среде. Эту трудность можно также обойти, добавив в среду небольшое количество вещества, которое образует с этими металлами растворимый комплекс (хелат) и предотвращает тем самым образование ими нерастворимого комплекса с фосфатами. Чаще всего для этого используют этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в концентрации около 0,01%.

ПОДДЕРЖАНИЕ АЭРОБНЫХ УСЛОВИЙ

Для жизни облигатных аэробов необходим кислород. Аэробные микроорганизмы хорошо растут на поверхности агара на чашках или в тонком слое жидкой среды. В перемешиваемых жидких культурах рост обычно происходит только у поверхности, а в глубине создаются анаэробные условия, и рост там невозможен. Поэтому для получения больших популяций в жидких культурах *среду необходимо аэрировать*. С этой целью в лабораториях используют различные устройства для встряхивания, которые аэрируют среду, непрерывно перемешивая ее. Применяют также другой способ аэрации, который состоит в том, что через культуру все время пропускают струю воздуха. Чтобы увеличить поверхность контакта между газом и жидкостью, воздух можно подавать через пористый «разбрызгиватель», из которого он выходит очень мелкими пузырьками.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОБЛИГАТНЫХ АНАЭРОБОВ

Многие строго анаэробные микроорганизмы весьма чувствительны к молекулярному кислороду и быстро гибнут при контакте с ним. Поэтому соприкосновение таких культур с воздухом должно быть сведено к минимуму или даже полностью исключено. Кроме того, рост некоторых строгих анаэробов может начинаться только в средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (около 150 мВ или еще

ниже). Поэтому при выращивании многих анаэробов нужно предварительно добавлять в культуральную среду какой-либо восстановитель, например цистеин, тиогликолевую кислоту, Na_2S или аскорбат натрия. Приготовив такую среду, следует при ее хранении и использовании исключить доступ воздуха. Во время роста культуры для этого можно подавать в сосуд газ, не содержащий кислорода: CO_2 или N_2 .

Культуры строгих анаэробов в жидкой среде обычно выращивают в пробирках или колбах, доверху заполненных средой и закрытых резиновой пробкой или завинчивающейся пластмассовой крышкой. При использовании твердых сред можно избежать соприкосновения культур с воздухом несколькими способами. Организмы, способные переносить кратковременный контакт с воздухом, можно выделять методом посева штрихом на чашках, которые затем помещают в герметически закрывающиеся анаэробные эксикаторы. После этого удаляют кислород, для чего воздух откачивают и эксикатор заполняют каким-нибудь инертным газом (например, N_2) или же помещают внутрь вещество, поглощающее O_2 . Иногда комбинируют оба эти способа удаления кислорода. Для выделения более чувствительных к кислороду анаэробов лучше применить метод разведения в агаре и сразу же после засева пробирки запечатать. В одной из модификаций этого метода используют вращающиеся пробирки, в которых расплавленный агар распределяется тонким слоем по стенкам. Пробирку заполняют газовой смесью, не содержащей кислорода, а затем закрывают резиновой пробкой.

СНАБЖЕНИЕ КУЛЬТУР УГЛЕКИСЛОТОЙ

При культивировании фотоавтотрофов и хемоавтотрофов часто нужно бывает обеспечить клетки достаточным количеством углекислоты. Культура может расти за счет CO_2 , поступающей в культуральную среду из воздуха путем диффузии; однако концентрация CO_2 в атмосфере крайне низка (0,03% на открытом воздухе и лишь несколько выше в закрытых помещениях), поэтому для автотрофов углекислота нередко оказывается фактором, лимитирующим рост. Чтобы создать лучшие условия, культуру насыщают воздухом, искусственно обогащенным CO_2 (до концентрации 1—5%). По рассмотренным выше причинам (см. стр. 63) это усложняет задачу контроля pH, в связи с чем приходится видоизменять буферную систему среды. При культивировании автотрофов, способных расти в анаэробных условиях в закрытых сосудах (например, пурпурных и зеленых серобактерий), потребность в CO_2 можно удовлетворить, добавив в среду NaHCO_3 . Растворимые карбонаты нельзя использовать в средах, находящихся в контакте с воздухом, так как быстрый выход CO_2 в атмосферу ведет к сильному подщелачиванию среды.

Для выращивания фототрофных микроорганизмов (водорослей, фотосинтезирующих бактерий) необходим свет. Обеспечить одновременно и достаточное освещение, и нужную температуру — задача довольно трудная. При культивировании нефотосинтезирующих организмов для поддержания надлежащей температуры используют термостаты. Однако большинство имеющихся в продаже термостатов не снабжено системой внутреннего освещения, и их нельзя использовать при выращивании фототрофных организмов.

Выставляя культуру на дневной свет, можно получить довольно плохо контролируемое и непостоянное освещение. При этом следует избегать прямого солнечного света, так как его интенсивность может оказаться чрезмерной и культура может настолько сильно нагреться, что ее рост окажется невозможным. Многие фототрофные микроорганизмы толерантны к постоянному освещению; в этих условиях они растут гораздо быстрее, поэтому выгоднее использовать искусственное освещение. При этом большое значение имеет спектральный состав света. В некоторых отношениях более удобны флуоресцентные лампы, так как они дают относительно мало тепла, что облегчает поддержание нужной температуры. Однако в длинноволновой области видимой части спектра и в ближней инфракрасной области излучение таких ламп слабее по сравнению с солнечным светом. Эти лампы можно применять при культивировании водорослей и цианобактерий, осуществляющих фотосинтез при длинах волн менее 700 нм; но они совсем не дают или дают очень мало света с длинами волн от 750 до 1000 нм, который необходим для фотосинтеза пурпурных и зеленых бактерий. Для этих групп фотосинтезирующих бактерий в качестве источников искусственного света приемлемы только лампы накаливания, так что если нужна высокая интенсивность освещения, то возникают трудности с отводом тепла. Проще всего в этом случае помещать сосуды с культурой в освещаемую сбоку стеклянную или пластмассовую водяную баню, температуру которой можно стабилизировать, создавая циркуляцию воды. Можно также помещать культуры вместе с лампами накаливания в бокс и поддерживать в нем надлежащую температуру с помощью вентиляции или холодильного устройства.

СЕЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ

Ясно, что нет такой среды или таких условий, в которых могли бы расти все разнообразные типы микроорганизмов, встречающиеся в природе. Поэтому любая среда, подходящая для роста какого-то определенного организма, будет для него в некоторой степени *селективной*. В любой засеянной разными микроорганизмами среде размножаться будут лишь

те из них, которые способны там расти, а развитие всех других видов в этой среде будет подавлено. Если все потребности организма известны, то можно подобрать условия, специфически благоприятные для развития именно этого организма, что позволит выделить его даже из такой смешанной популяции, в которой он составляет лишь небольшую примесь. Либо путем *прямого выделения*, либо путем *обогащения* можно избирательно получать те или иные виды из природных местообитаний (например, из почвы или из воды).

ПРЯМОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ

Если по поверхности селективной твердой среды (в которую добавлен агар или какое-либо иное гелеобразующее вещество) рассеять смешанную популяцию микробов, то каждая способная к росту клетка в конце концов даст колонию. В результате распределения микробов по поверхности твердой среды конкуренция между клетками за питательные вещества существенно уменьшается. В этих условиях даже сравнительно медленно растущие организмы смогут образовать колонии. Прямым высевом на чашки с селективной средой пользуются тогда, когда хотят сразу выделить довольно много различных микроорганизмов, способных расти в данных условиях.

ОБОГАЩЕНИЕ. НАКОПИТЕЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Если смешанную популяцию микробов внести в жидкую селективную среду, то различные организмы будут конкурировать друг с другом за питательные вещества. Поэтому в жидких накопительных культурах из всех членов внесенной популяции, способных расти в данных условиях, постепенно отбираются те, которые растут с наибольшей скоростью.

Селективность накопительной культуры определяется не только химическим составом среды. Получаемый в данной среде результат обогащения может существенно изменяться в зависимости от таких факторов, как температура, pH, ионная сила, освещенность, аэрация или источник инокулята. Например, для роста или для накопления энтеробактерий, относящихся к родам *Escherichia* и *Enterobacter*, можно использовать среду 2 (табл. 2.6). Представители первого из этих родов являются обычными обитателями кишечного тракта теплокровных животных, а представители второго живут в почве. Естественно, что штаммы *Escherichia* приспособлены к росту при несколько более высоких температурах, чем штаммы *Enterobacter*, и, кроме того, менее чувствительны к токсическому действию желчных солей. Поэтому среду 2 можно использовать как селективную для бактерий рода *Escherichia*, если повысить температуру инкубации (до 45°) или добавить желчные соли.

67 Селекцию с помощью температуры можно весьма успеш-

но использовать также и для выделения цианобактерий, которые по типу питания и метаболизму очень сходны с многими водорослями. И водоросли, и цианобактерии могут расти в простой минеральной среде на свету при 25°C. Однако развитие водорослей можно почти полностью исключить, если проводить инкубацию при 35°C, так как температурный оптимум для водорослей, как правило, ниже, чем для цианобактерий.

Если вначале накопительная среда и не обладает высокой селективностью, то селективность ее для одного из микроорганизмов может резко возрасти в результате тех химических изменений, которые вызывает этот организм при своем росте. Например, бактерии и дрожжи, осуществляющие брожение, обычно менее чувствительны к образующим ими из углеводов органическим конечным продуктам, чем другие организмы. Поэтому их развитие в богатой углеводами среде будет подавлять рост конкурирующих микроорганизмов.

При выделении спорообразующих бактерий (роды *Bacillus* и *Clostridium*) можно полностью исключить конкуренцию со стороны видов, не образующих спор, если предварительно обработать надлежащим образом инокулят. Пастеризация инокулята, т. е. кратковременный прогрев при высокой температуре (2—5 мин при 80°C), уничтожит все вегетативные клетки, но не убьет гораздо более устойчивые споры.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР НЕКОТОРЫХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

Техника накопительных культур — один из наиболее мощных методов, имеющихся в распоряжении микробиолога. Для выделения определенных микроорганизмов из природных источников можно использовать почти бесконечное множество комбинаций различных внешних факторов, как химических, так и физических. Методы обогащения позволяют по желанию выделять те или иные типы микробов, используя их специфические потребности. Эти методы можно безгранично варьировать с целью выделения и изучения не описанных ранее организмов, способных расти в условиях, созданных исследователем. Здесь мы попытаемся кратко описать ряд методов обогащения, которые могут быть использованы для выделения из природных источников основных физиологических групп микроорганизмов, главным образом бактерий.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ХЕМОГЕТЕРОТРОФОВ

Условия и питательные вещества, необходимые для накопления в синтетической среде различных хемогетеротрофов, указаны в табл. 2.8, а подробно состав каждой из таких сред приведен в табл. 2.9.

ТАБЛИЦА 2.8

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, СУЩЕСТВЕННЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР ХЕМОГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В СИНТЕТИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Органические субстраты, отсутствие света	— Аэробные условия	— Предпочтительно несбраживаемый субстрат	— N_2 в качестве единственного источника азота	(Azotobacter)
— Анаэробные условия	—	— Предпочтительно несбраживаемый субстрат	— Присутствие связанного азота	(Аэробы, например <i>Pseudomonas</i>)
			— NO_3^- как акцептор электронов	(Денитрифицирующие бактерии)
			— SO_4^{2-} как акцептор электронов	(<i>Desulfovibrio</i>)
			— CO_2 как акцептор электронов	(Метанобактерии)
—	—	— Сбраживаемый сахар	— N_2 в качестве единственного источника азота	(<i>Clostridium pasteurianum</i> и родственные виды)
			— Присутствие связанного азота	(Бактерии, осуществляющие брожение, например <i>Enterobacter</i>)

ТАБЛИЦА 2.9

УСЛОВИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР
ХЕМОГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ¹⁾

Добавки к основной среде ²⁾		Особые условия среды		Накапливаемые организмы
органические	неорганические	атмосфера	pH	
Этиловый спирт, 4,0	Нет	Воздух	7,0	<i>Azotobacter</i>
Этиловый спирт, 4,0	NH ₄ Cl, 1,0	Воздух	7,0	Аэробы (например, <i>Pseudomonas</i>)
Этиловый спирт, 4,0	NaNO ₃ , 3,0	Нет (сосуд закрыт)	7,0	Денитрифицирующие бактерии (например, некоторые виды <i>Pseudomonas</i>)
Этиловый спирт, 4,0	NH ₄ Cl, 1,0 Na ₂ SO ₄ , 5,0	Нет (сосуд закрыт)	7,2	<i>Desulfovibrio</i>
Этиловый спирт, 4,0	NH ₄ Cl, 1,0 NaHCO ₃ , 1,0 CaCO ₃ , 5,0	Нет (сосуд закрыт)	7,4	Метанообразующие бактерии
Глюкоза, 10,0	CaCO ₃ , 5,0	Чистый N ₂	7,0	<i>Clostridium pastorianum</i> и родственные виды
Глюкоза, 10,0	NH ₄ Cl, 1,0	Нет (сосуд закрыт)	7,0	Энтеробактерии (например, <i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i>)

¹⁾ Инкубация при 25—30 °С, в темноте. Основная среда (содержание компонентов в г/л): MgSO₄·7H₂O, 0,2; K₂HPO₄, 1,0; FeSO₄·7H₂O, 0,05; CaCl₂, 0,02; MnCl₂·4H₂O, 0,002; NaMoO₄·2H₂O, 0,001.

²⁾ Количества их указаны в граммах на 1 л.

Для накопления организмов, осуществляющих брожение, важна химическая природа органического субстрата. Чтобы субстрат мог сбраживаться, он не должен быть ни слишком окислен, ни слишком восстановлен. Прекрасными субстратами для брожения служат сахара, но сбраживаться могут и многие другие органические соединения примерно того же уровня окисленности. Инкубацию накопительных культур следует проводить в анаэробных условиях — не только потому, что некоторые организмы, получающие энергию в результате брожения, являются облигатными анаэробами, но и для того, чтобы предотвратить конкуренцию со стороны аэробных форм. В качестве источника азота нельзя использовать нитрат, так как в этом случае смогут расти и денитрифицирующие бактерии (см. ниже). Если накапливаемые организмы образуют кислоту, а сами к ней чувствительны, то можно добавить в среду углекислый кальций.

В синтетических средах при анаэробных условиях можно также проводить накопление трех особых физиологических групп хемогетеротрофных бактерий, для которых терминальными окислителями в дыхательном метаболизме вместо O₂

служат другие неорганические соединения. В этих случаях не следует использовать такие легко сбраживаемые органические субстраты, как сахара. Для денитрифицирующих бактерий в качестве терминального окислителя в среду добавляют нитрат, а в качестве источника углерода и энергии — уксусную кислоту, масляную кислоту или этиловый спирт. Для сульфатредуцирующих бактерий добавляют относительно высокие концентрации сульфата, так как для них это специфический терминальный окислитель; лучшими источниками углерода и энергии служит молочная или яблочная кислота, но не уксусная. Для карбонатвосстанавливающих (метанообразующих) бактерий в качестве окислителя необходима CO_2 , а источником энергии и углерода может служить, например, муравьиная кислота¹. Следует также отметить, что для накопления бактерий, восстанавливающих сульфаты и карбонаты, желательно использовать в качестве источника азота аммиак, так как добавление нитрата будет благоприятствовать развитию микроорганизмов, восстанавливающих нитраты. Для накопления бактерий, восстанавливающих карбонаты и нитраты, следует понизить до минимума концентрацию в среде сульфата, чтобы предотвратить усиленный рост сульфатредуцирующих бактерий.

Очевидно, что для накопления микроорганизмов, получающих энергию за счет аэробного дыхания, необходимы аэробные условия. Органическими питательными веществами в этом случае могут быть как сбраживаемые, так и несбраживаемые субстраты. Однако если используется сбраживаемый субстрат, то нужна обильная и постоянная аэрация культуры, так как истощение запасов кислорода в среде в результате дыхания благоприятствует накоплению анаэробов. Легко сбраживаемые соединения обычно стимулируют рост факультативных анаэробов. Поэтому при включении в накопительную среду глюкозы или какого-нибудь другого сахара как в аэробных, так и в анаэробных условиях вырастают главным образом виды *Enterobacter*.

Использование несбраживаемых субстратов приводит обыкновенно к накоплению облигатных аэробов, чаще всего представителей рода *Pseudomonas*. Например, включая в качестве единственного органического вещества бензоат натрия (1 г/л), можно получить окисляющие бензоат штаммы *Ps. putida*. Если же единственным источником как углерода, так и азота будет аспарагин (2 г/л), то в культуре будут преобладать окисляющие аспарагин штаммы этого или родственных ему видов.

В синтетических средах для накопления аэробов в качестве источника азота обычно используют соли аммония. Если не добавлять соединений азота, то можно выделить куль-

туры азотфиксирующих аэробных бактерий рода *Azotobacter*. Виды *Azotobacter* могут использовать в качестве единственного органического питательного вещества огромное множество различных субстратов, включая спирт, масляную и бензойную кислоты и глюкозу.

НАКОПИТЕЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ ХЕМОАВТОТРОФНЫХ И ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ

Для накопления хемоавтотрофных и фотоавтотрофных организмов из среды следует исключить органические соединения, а в качестве единственного источника углерода использовать CO_2 или бикарбонат (табл. 2.10—2.13). Фотосинтезирующие

ТАБЛИЦА 2.10

ОСНОВНЫЕ ВНЕШНИЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР НЕКОТОРЫХ ХЕМОАВТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Отсутствие в среде органических соединений	Аэробные условия (кислород как акцептор электронов)	NH_4 в качестве окисляемого субстрата	<i>Nitrosomonas</i>
		NO_2^- в качестве окисляемого субстрата	<i>Nitrobacter</i>
		H_2 в качестве окисляемого субстрата	Водородные бактерии
		S или $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ в качестве окисляемого субстрата	<i>Thiobacillus</i>
	Анаэробные условия (NO_3^- как акцептор электронов)	S или $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ в качестве окисляемого субстрата	<i>Thiobacillus denitrificans</i>

ТАБЛИЦА 2.11

УСЛОВИЯ ДЛЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР НЕКОТОРЫХ ХЕМОАВТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ¹⁾

Добавки к основной среде	Специальные условия среды		Накапливаемые организмы
	атмосфера	pH	
NH_4Cl , 1,5 CaCO_3 , 5,0 NaNO_3 , 3,0 NH_4Cl , 1,0	Воздух	8,5	(<i>Nitrosomonas</i>)
		8,5	(<i>Nitrobacter</i>)
		7,0	(Водородные бактерии)
NH_4Cl , 1,0 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,0 NH_4NO_3 , 3,0 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,0 NaHCO_3 , 5,0	Нет (сосуд закрыт)	7,0	(<i>Thiobacillus</i>)
		7,0	(<i>Thiobacillus denitrificans</i>)
		7,0	(<i>Thiobacillus denitrificans</i>)

¹⁾ Содержание различных компонентов в среде указано в граммах на 1 л. Основная среда: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; K_2HPO_4 , 1,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05; CaCl_2 , 0,02; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,002; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001. Инкубация проводится в темноте при температуре 25—30 °C.

ТАБЛИЦА 2.12.

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

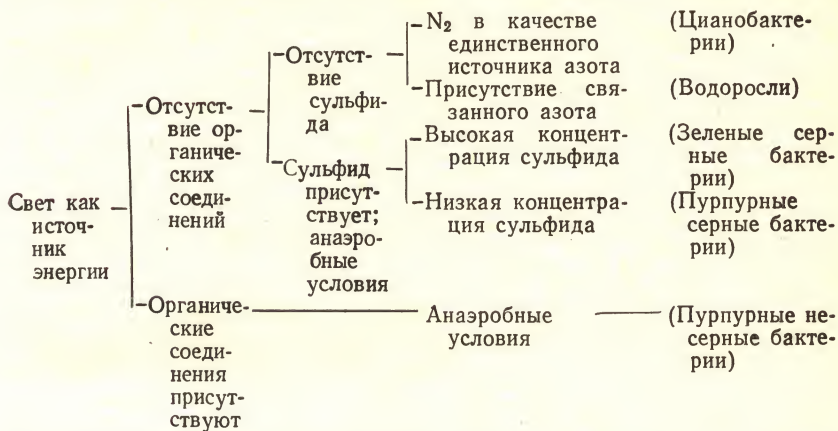


ТАБЛИЦА 2.13

УСЛОВИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ¹⁾

Добавки к основной среде		Условия среды		Накопляемые организмы
органические	неорганические	атмосфера	pH	
Нет	Нет	Воздух (или воздух + +5% CO ₂)	6,0—8,0	Цианобактерии
Нет	NaNO ₃ или NH ₄ Cl, 1,0	Воздух (или воздух + +5% CO ₂)	6,0—8,0	Водоросли
Нет	NH ₄ Cl, 1,0; Na ₂ S·9H ₂ O, 2,0; NaHCO ₃ , 5,0	Нет (сосуд закрыт)	7,5	Зеленые серные бактерии
Нет	NH ₄ Cl, 1,0; Na ₂ S·9H ₂ O, 1,0; NaHCO ₃ , 5,0	Нет (сосуд закрыт)	8,0—8,5	Пурпурные серные бактерии
Молочнокислый натрий, 5,0; дрожжевой экстракт, 0,5	NH ₄ Cl, 1,0	Нет (сосуд закрыт)	7,0—7,5	Пурпурные несерные бактерии

¹⁾ Содержание различных компонентов в среде указано в граммах на 1 л. Основная среда: MgSO₄·7H₂O, 0,2; K₂HPO₄, 1,0; FeSO₄·7H₂O, 0,01; CaCl₂, 0,02; MnCl₂·4H₂O, 0,002; NaMoO₄·2H₂O, 0,001; NaCl, 0,5. Инкубация при температуре 25—30 °C и постоянном освещении.

формы нуждаются в свете, а культуры хемоавтотрофов нужно выращивать в темноте, чтобы предотвратить развитие фотосинтезирующих микроорганизмов. Во время инкубации культур необходимо поддерживать либо аэробные, либо анаэробные условия в зависимости от того, нуждаются ли данные организмы в кислороде. Исключение из этого правила составляют водоросли: так как они в процессе метаболизма сами выделяют кислород, то фактически все равно, будем ли мы инкубировать накопительные культуры водорослей в аэробных или в анаэробных условиях.

Среды, предназначенные для получения накопительных культур и выращивания фотосинтезирующих организмов, должны содержать натрий, так как известно, что этот элемент необходим для фотосинтезирующих бактерий.

Среда для накопления несерных пурпурных бактерий должна содержать подходящий органический субстрат, а иногда и бикарбонат. Этот субстрат не должен легко сбраживаться; обычно используют уксусную, масляную или яблочную кислоту. Если углерод в субстрате (как, например, в масляной кислоте) восстановлен в большей степени, чем в материале клетки, то нужно добавлять в среду бикарбонат, так как фотосинтез сопровождается потреблением CO_2 . При использовании таких субстратов, как яблочная кислота, при метаболизме которых образуется CO_2 , добавление бикарбоната не обязательно. Так как фотогетеротрофные бактерии нуждаются в различных факторах роста, то обычно в среду для их накопления добавляют небольшое количество дрожжевого экстракта.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЛОЖНЫХ СРЕД

Накопительные культуры некоторых бактерий, обладающих крайне сложными потребностями в питательных веществах, получить в среде определенного состава невозможно. Тем не менее иногда такие организмы можно выделить из природных источников, используя специально разработанные сложные среды. Примером могут служить молочнокислые бактерии. Для них характерна высокая устойчивость к молочной кислоте, которую они сами образуют при сбраживании сахара. Для накопления молочнокислых бактерий используют слабо забуференную среду, содержащую глюкозу и какой-нибудь богатый источник факторов роста (например, 20 г глюкозы и 10 г дрожжевого экстракта на 1 л среды). После инокуляции, которую желательно производить природным материалом, содержащим много молочнокислых бактерий (например, кусочками овощей, сырым молоком, сточными водами), проводят инкубацию при анаэробных условиях. Обычно сначала развиваются такие бактерии, как *Enterobacter* и *Escherichia*. Однако постепенно в среде накапливается молочная кислота и условия становятся все менее и менее благо-

приятными для этих бактерий, тогда как молочнокислые бактерии продолжают расти. В конце концов среда закисляется настолько, что начинают преобладать молочнокислые бактерии, а большинство других организмов погибает.

Еще один пример сложной среды, достаточно селективной для определенной группы организмов,— это среда, предназначенная для накопления пропионовокислых бактерий. Эти бактерии образуют при брожении пропионовую кислоту, уксусную кислоту и CO_2 . Хотя они легко сбраживают глюкозу, они не могут конкурировать в содержащей глюкозу среде ни с *Enterobacter*, ни с молочнокислыми бактериями, так как растут сравнительно медленно и не выносят кислых условий. Однако пропионовокислые бактерии могут также сбраживать и молочную кислоту, которая не является подходящим субстратом для большинства других организмов, осуществляющих брожение. Эту способность и используют для их накопления. С этой целью нейтральную среду, содержащую 20 г лактата натрия и 10 г дрожжевого экстракта на 1 л, засевают каким-нибудь природным материалом, содержащим пропионовокислые бактерии, и инкубируют при 30 °C в анаэробных условиях. Наилучшим инокулятом для получения таких культур служит швейцарский сыр, так как его созревание обусловлено в основном деятельностью пропионовокислых бактерий.

Сложные среды можно с успехом использовать и для селективного культивирования уксуснокислых бактерий. Эти бактерии хорошо приспособлены к среде с высокими концентрациями спирта. Кроме того, они менее других бактерий чувствительны к уксусной кислоте, которую они образуют из спирта при дыхании. Для их накопления сложную среду, содержащую спирт, инокулируют соответствующим материалом и инкубируют в аэробных условиях. Хорошими источниками инокулята могут быть плоды, цветки и непастеризованное (взятое прямо из бочки) пиво. Можно использовать среду, содержащую 40 мл спирта и 10 г дрожжевого экстракта на 1 л, с рН, доведенным до 6,0. Пиво и крепкий сидр также служат прекрасными накопительными средами, так как эти напитки близки к той природной среде, в которой хорошо растут уксуснокислые бактерии. Культура должна иметь большую поверхность контакта с воздухом, но инокулированную среду обычно сильно не аэрируют, так как многие уксуснокислые бактерии лучше всего растут в пленке, которую они образуют на поверхности.

В табл. 2.14 приведены примеры сложных сред, используемых для накопления отдельных видов органотрофов.

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Чтобы понять, насколько незаменим микроскоп в микробиологических исследованиях, нужно вспомнить об ограничениях, присущих глазу как оптическому прибору. Видимая ве-

ТАБЛИЦА 2.14

СЛОЖНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ
ХЕМОГЕТЕРОТРОФОВ¹⁾

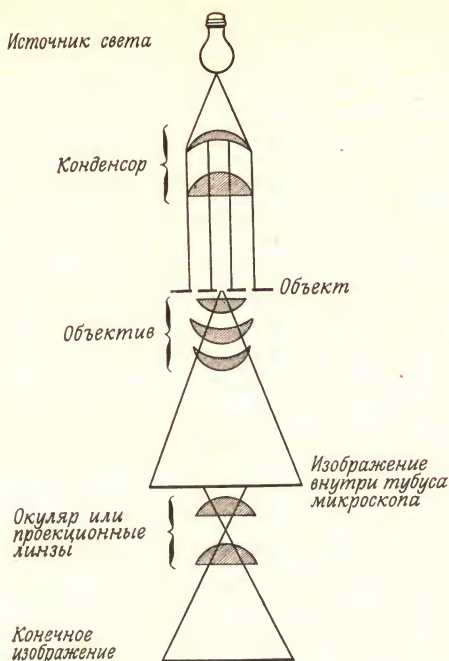
Добавки	Особые условия среды	Предпочтительный источник инокулята	Накапливаемые организмы
Нет	pH 7,0; аэробные условия	Почва	Аэробы, окисляющие аминокислоты
Нет	pH 7,0; аэробные условия	Пастеризованная почва	<i>Bacillus</i> spp.
Нет	pH 7,0; анаэробные условия	Пастеризованная почва	Клостридии, сбраживающие аминокислоты
Мочевина, 50,0	pH 8,5; аэробные условия	Пастеризованная почва	Толерантные к щелочи бациллы, расщепляющие мочевину (<i>Bacillus pasteurii</i>)
Глюкоза, 20,0	pH 2,0—3,0; анаэробные условия	Почва	Анаэробные сарцины
Глюкоза, 20,0	pH 6,5; анаэробные условия	Растительные материалы, молоко	Молочнокислые бактерии
Глюкоза, 20,0; CaCO ₃ , 20,0	pH 7,0; аэробные или анаэробные условия	Почва или сточные воды	Энтеробактерии
Глюкоза, 20,0; CaCO ₃ , 20,0	pH 7,0; анаэробные условия	Пастеризованная почва	Клостридии, сбраживающие сахара
Лактат натрия, 20,0	pH 7,0; анаэробные условия	Швейцарский сыр	Пропионовокислые бактерии
Этанол, 40,0	pH 6,0; аэробные условия	Фрукты, непастеризованное пиво	Уксуснокислые бактерии

¹⁾ Общими для этих сред компонентами являются: дрожжевой экстракт, 10,0; K₂HPO₄ или K₂HPO₄, 1,0; MgSO₄, 0,2 (содержание всех компонентов указано в граммах на 1 л). Обычно инкубацию проводят при 30 °С.

личина объекта прямо пропорциональна углу, под которым этот предмет рассматривается. Значит, если расстояние от глаза до объекта уменьшится вдвое, то видимые размеры объекта увеличатся вдвое. Однако глаз человека не может сфокусироваться на предметах, находящихся от него на расстоянии меньше примерно 25 см. Это и есть то расстояние, на котором достигается максимальная разрешающая способность. Чтобы вообще можно было увидеть объект, его угловые размеры должны быть не менее 1'. При расстоянии в 25 см это соответствует частице величиной около 0,1 мм.

Большинство клеток (а значит, и большинство одноклеточных организмов) слишком малы, чтобы их можно было увидеть невооруженным глазом. Поэтому для того, чтобы обнаружить такие организмы и рассмотреть их форму и строение, необходим микроскоп. Назначение системы линз этого прибора, расположенных между объектом и глазом, состоит в том, чтобы увеличить кажущийся угол, под которым

Рис. 2.6. Схема сложного светового микроскопа для наблюдения в светлом поле, отрегулированного для освещения по Кёлеру.



виден объект в поле микроскопа. Помимо *увеличения*, большое значение имеют также *контрастность* и *разрешение*. Чтобы объект можно было различить под микроскопом, необходима определенная *степень контраста* между этим объектом и окружающим фоном, а для получения четкого увеличенного изображения микроскоп должен обладать достаточной *разрешающей способностью*, которая позволяла бы раздельно воспринимать очень близкие точки изображения.

СВЕТОВОЙ МИКРОСКОП

Как уже говорилось в гл. 1, Левенгук открыл мир микробов, пользуясь простыми микроскопами с одной короткофокусной двояковыпуклой линзой. Для разработки используемых теперь *сложных* микроскопов и их усовершенствования потребовалось почти два века исследований по прикладной оптике.

В современном сложном микроскопе имеются три отдельные системы линз (рис. 2.6). *Конденсор*, расположенный между источником света и объектом, собирает лучи света в поле микроскопа. *Объектив* создает увеличенное изображение поля микроскопа внутри тубуса, а *окуляр* еще увеличивает это изображение и делает возможным восприятие его глазом.

Простым линзам присущи два оптических дефекта. Они неспособны сфокусировать одновременно все поле микро-

па (*сферическая аберрация*) и создают окрашенную кайму вокруг изображения (*хроматическая аберрация*). Эти дефекты можно почти полностью устранить, поместив рядом с основной линзой дополнительные корригирующие линзы. Поэтому и объектив, и окуляр современного сложного микроскопа составляют из нескольких линз, чтобы свести эти аберрации к минимуму.

Для получения четкого изображения очень важно правильно отрегулировать конденсорную линзу. При использовании больших увеличений необходимо установить конденсор так, чтобы обеспечить *критическое освещение* поля микроскопа: лучи света от источника должны фокусироваться в плоскости объекта, а световое поле должно занимать линзу объектива почти полностью.

ПРЕДЕЛ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ

Максимальное полезное увеличение, достижимое с помощью светового микроскопа, определяется физическими свойствами света. Так как свет имеет волновую природу, очень малый объект будет виден в микроскоп как диск, окруженный рядом светлых и темных колец. Две соседние точки объекта можно «разрешить», т. е. они будут восприниматься отдельно, только в том случае, если эти окружающие их кольца не перекрываются. *Пределом разрешения* называется наименьшее расстояние между двумя точками, при котором их еще можно видеть раздельно. Именно этим расстоянием и определяется максимальное полезное увеличение светового микроскопа.

Величину предельного разрешения (d) дает уравнение

$$d = \frac{0,5\lambda}{N \sin \alpha}, \quad (2.1)$$

где λ — длина волны используемого источника света, α — половина угла линзы объектива, т. е. угла между лучами, идущими от объекта к краям объектива, а N — показатель преломления среды между объектом (препаратом) и объективом. Знаменатель ($N \sin \alpha$), который обычно называют числовой апертурой (NA), отражает свойства объектива. До некоторого предела разрешающая способность увеличивается с увеличением числовой апертуры. Если между препаратом и объективом находится воздух, то значение NA может достигать примерно 0,65 и лимитируется реально возможным диаметром линзы объектива. Значение N можно увеличить, если пространство между препаратом и объективом заполнить маслом, у которого показатель преломления значительно больше, чем у воздуха. Применяя иммерсионное масло и *иммерсионные линзы*, можно увеличить значение NA до 1,4, хотя обычно оно при этом достигает примерно 1,25. Если ис-

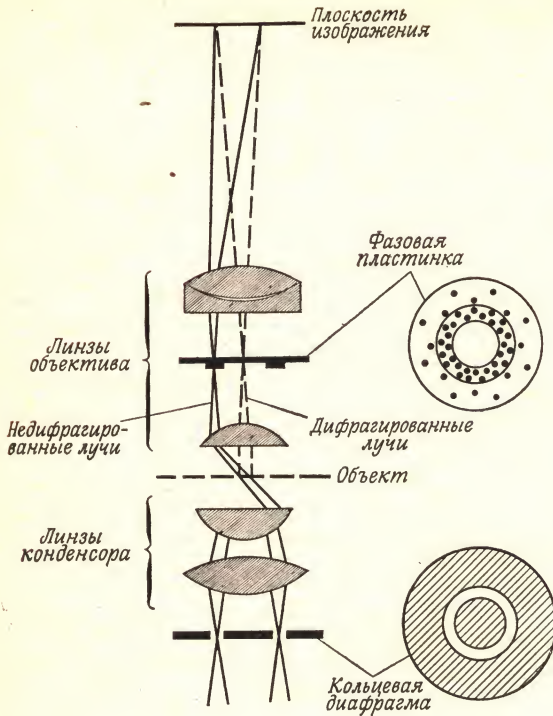
пользовать видимый свет с наименьшей длиной волны (около 426 нм), то при наилучших возможных условиях максимальное разрешение светового микроскопа приближается к 200 нм. Иными словами, с помощью светового микроскопа нельзя получить отдельные изображения двух точек, расстояние между которыми меньше 200 нм.

КОНТРАСТ В СВЕТОВОМ МИКРОСКОПЕ И ЕГО ПОВЫШЕНИЕ

Мелкие живые биологические объекты, например клетки микробов, рассматривают под микроскопом обычно в тонком слое водной среды, заключенном между предметным и покровным стеклами. При этом видимость объекта обусловлена тем, что он пропускает света меньше, чем окружающая его среда, и в результате между объектом и средой создается некоторый контраст. Объект пропускает меньше света, во-первых, потому, что часть света поглощается клеткой, и во-вторых, потому, что часть его выводится из оптического пути микроскопа в результате различия в показателях преломления клетки и окружающей среды. Если не считать некоторых сильно окрашенных структур (каковы, например, хлоропласты), биологические объекты обычно очень слабо поглощают в видимой области спектра. Поэтому контраст живой клетки обусловлен почти исключительно преломлением света. Однако степень контраста можно сильно повысить, применив окрашивание. Обработка такими красителями, которые избирательно связываются всей клеткой или определенными ее компонентами, приводит к значительно более сильному поглощению света. Большинство методов окрашивания вызывает гибель клеток, и поэтому перед окрашиванием клетки обычно *фиксируют*, т. е. проводят определенную их химическую обработку, чтобы по возможности уменьшить структурные изменения в клетках после их гибели. Обычно для этого применяют растворы, содержащие осмиевую кислоту и альдегиды, особенно часто глутаральдегид.

Микробные клетки чаще всего не нуждаются в окрашивании, чтобы сделать их видимыми. Проще всего наблюдать микроорганизмы в живом состоянии, во *влажном препарате*, и для многих целей этого достаточно. Главная ценность окрашивания состоит в том, что оно дает возможность получать *специфическую информацию о внутренней структуре клетки или ее химических свойствах*. Например, специфическое окрашивание дезоксирибонуклеиновой кислоты позволяет выявить структуру и локализацию ядра. Много специальных методов окрашивания используется для получения данных о внутриклеточном отложении таких резервных материалов, как гликоген, полифосфаты и поли- β -оксимасляная кислота. Окраска по Граму (см. стр. 171) и прочные кислые красители (см. т. 3, гл. 23) позволяют получать сведения о

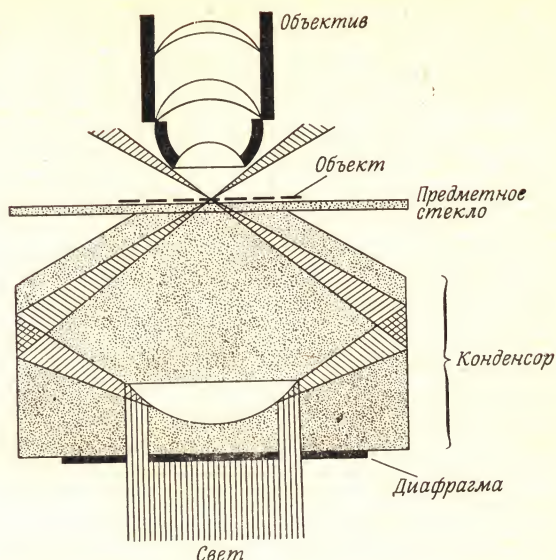
Рис. 2.7. Схема фазово-контрастного микроскопа.



составе слоев клеточной стенки у бактерий. Иногда для выявления поверхностных слоев с очень низким показателем преломления, например слизи или капсул, часто окружающих клетки микробов, используют так называемые *негативные красители*, которые не проникают внутрь клетки. Такие слои можно выявить, добавив в среду, в которой суспендированы клетки, тушь. Содержащиеся в ней частицы угля не могут проникнуть через капсулу, и она выявляется в виде окружающей клетку светлой зоны (см. рис. 5.41).

Фазово-контрастная микроскопия. Относительно слабый контраст при наблюдении живых клеток в обычный световой микроскоп можно значительно усилить, если использовать прибор с видоизмененной оптической системой — так называемый фазово-контрастный микроскоп (рис. 2.7). Метод фазового контраста основан на том, что фазовая скорость света обратно пропорциональна показателю преломления. Поэтому фаза луча, проходящего через объект с более высоким показателем преломления, чем у окружающей среды, будет запаздывать по сравнению с фазой того луча, который проходит только через среду. Система колец в конденсоре и объективе отделяет те лучи, которые дифрагировали (отклонились) на объекте, от тех, которые не дифрагировали. После того как дифрагировавшие лучи проходят через стеклянное

Рис. 2.8. Схема освещения для наблюдения в темном поле.



кольцо (фазовую пластинку), вносящее дополнительный сдвиг по фазе, они рекомбинируются с теми лучами, которые не дифрагировали. С помощью такого видоизменения оптики можно резко повысить контраст клеток или внутриклеточных структур, очень мало отличающихся по показателю преломления от окружающей среды.

Темнопольное освещение. При освещении небольшого объекта часть света рассеивается и объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Это явление используется в методе темнопольного освещения, позволяющего выявлять такие объекты, которые слишком малы, чтобы их можно было увидеть при обычном освещении, или почему-либо не создают достаточного контраста. Такое освещение достигается с помощью специального конденсора, который фокусирует на препарате полый конус света (рис. 2.8), расходящиеся пучки которого не попадают в объектив. Через объектив проходит и создает изображение только тот свет, который рассеивается на объекте.

УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ И ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Так как разрешающая способность светового микроскопа находится в прямой зависимости от длины волны используемого света, можно несколько повысить разрешение (примерно вдвое), если освещать объект ультрафиолетовыми лучами. Для коротковолнового ультрафиолета стекло непрозрачно, поэтому линзы в таком микроскопе должны быть изготовлены из кварца; изображение приходится фотографировать,

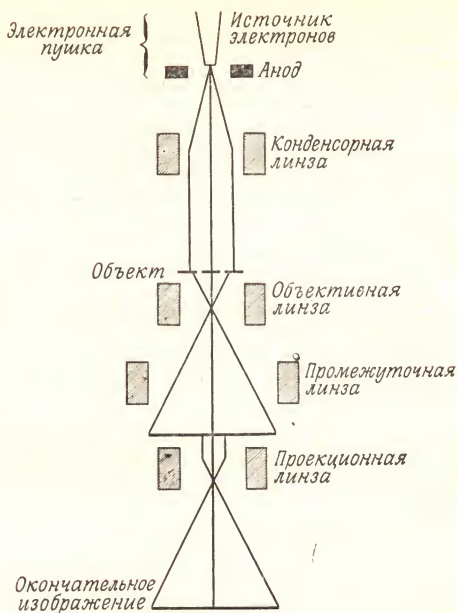
так как глаз ультрафиолетовых лучей не воспринимает. Из-за большой стоимости оборудования и его сложности ультрафиолетовая микроскопия находит лишь ограниченное применение. Однако ее модификация, так называемая *флуоресцентная* микроскопия, часто применяется для решения ряда важных биологических вопросов.

Некоторые химические соединения поглощают ультрафиолетовые лучи, но часть поглощенной энергии испускают в виде света с большими длинами волн, относящихся уже к видимой области спектра. Это явление называется *флуоресценцией*. Если облучать флуоресцирующий объект ультрафиолетом, то он будет ярко светиться на темном фоне. В этом и заключается принцип флуоресцентной микроскопии. Так как флуоресцирующий объект испускает видимый свет, который и проходит через микроскоп, то в этом случае из кварца должен быть изготовлен один лишь конденсор. В биологии флуоресцентная микроскопия используется в основном при методике *иммунофлуоресценции*. Если животное иммунизировать специфическим антигеном (например, какой-то определенной бактерией), то в его сыворотке будут содержаться антитела, специфически взаимодействующие с этим антигеном. Если к молекулам антител химически присоединить флуоресцирующий краситель, они приобретают способность интенсивно флуоресцировать; и когда такие антитела связываются со специфическим антигеном, весь этот комплекс оказывается флуоресцирующим. Поэтому с помощью флуоресцентной микроскопии можно специфически выявлять клетки определенного вида бактерий в смешанной популяции микробов, если эту популяцию обработать флуоресцирующей антисывороткой к данной бактерии. Этот метод использовали также при изучении роста клеточной стенки у бактерий (см. гл. 11).

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Одно из крупнейших достижений прикладной физики XX века — это создание электронного микроскопа; оно привело к перевороту в наших представлениях о биологических структурах. Электронная микроскопия основана на том, что электромагнитное поле влияет на пучок электронов аналогично тому, как стеклянная линза действует на луч света. Электронный луч обладает свойствами электромагнитного излучения с очень малой длиной волны. Если электроны ускорены в электрическом поле напряжением 100 кВ, то длина такой волны составляет всего лишь 0,04 нм, т. е. примерно в 10 000 раз меньше, чем у видимого света. Соответственно и предельное разрешение электронного микроскопа на несколько порядков выше, чем у светового [см. уравнение (2.1)], и с его помощью можно достичь гораздо большего эффектив-

Рис. 2.9. Схема трансмиссионного электронного микроскопа.



ного увеличения. Как показано на рис. 2.9, путь электронов в трансмиссионном электронном микроскопе аналогичен пути света в световом микроскопе (рис. 2.6). Выходящий из электронной пушки пучок электронов проходит через ряд электромагнитных линз. Конденсорная линза коллимирует электронный пучок на препарате, а несколько увеличивающих линз создают увеличенное изображение. Будучи спроецировано на флуоресцирующий экран (аналогичный экрану телевизора), оно становится видимым. Поскольку воздух препятствовал бы движению электронов, весь путь электронного пучка должен находиться в высоком вакууме; поэтому изучаемый объект должен быть предварительно полностью высушен. Так как электроны обладают низкой проникающей способностью, в электронном микроскопе можно исследовать лишь очень тонкие срезы толщиной не более 100 нм.

В трансмиссионном электронном микроскопе контраст обусловлен тем, что электроны по-разному рассеиваются на различных участках препарата, причем эффективность их рассеяния зависит от числа и массы атомов, находящихся на пути пучка. Так как в состав биологических материалов входят в основном атомы с небольшой массой, контрастность таких материалов невысока. Однако ее можно значительно повысить, «окрашивая» препарат солями различных тяжелых металлов (например, свинца, вольфрама или урана), которые могут быть фиксированы на самом объекте (позитивное контрастирование) или использованы для повышения электронной плотности окружающего поля (негативное контрастиро-

Рис. 2.10. Микрофотография плодовых тел миксобактерии *Chondromyces*

crocatus, полученная с помощью сканирующего электронного микроско-

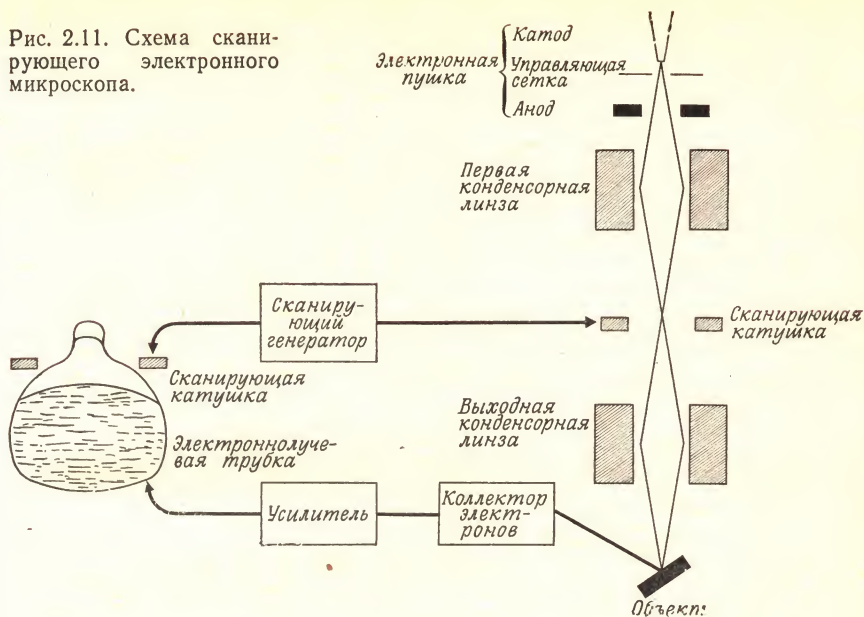
па; $\times 820$. (Фото предоставлено Дж. Пенгборном и П. Гильоне.)



вание). Применение негативного контраста особенно выгодно при исследовании таких мельчайших структур, как вирусные частицы, белковые молекулы или жгутики бактерий (см. рис. 12.3). Однако клетки даже очень мелких микроорганизмов имеют слишком большую толщину, чтобы их можно было целиком наблюдать в электронный микроскоп. Для того чтобы выявить внутреннюю тонкую структуру клеток, их фиксируют, обезвоживают, заключают в пластик и делают срезы. Затем такие ультратонкие срезы (толщиной не более 50 нм) контрастируют солями тяжелых металлов и уже после этого наносят на подложку.

При исследовании биологических объектов в трансмиссионном электронном микроскопе часто применяют два других метода приготовления препаратов: *напыление металлом* и *«замораживание — травление»* (freeze-etching). При напылении металлом на высушенный препарат под острым углом направляют поток ионов тяжелого металла (платины, палладия или золота) и в результате получают изображение, которое выявляет трехмерную структуру объекта. При замораживании — травлении объект замораживают и замороженный блок расщепляют ножом микротомы, в результате чего обнажаются различные поверхности, имеющиеся у объекта и в ну-

Рис. 2.11. Схема сканирующего электронного микроскопа.



три него. Поверхность излома напыляют тяжелым металлом под острым углом, а уже на металл напыляют углеродную пленку подложки. Затем специальной химической обработкой объект разрушают и исследуют под микроскопом его отпечаток. Метод замораживания — травления особенно полезен при изучении структуры клеточных стенок и мембран.

СКАНИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП

Как световой, так и электронный трансмиссионный микроскоп дает по существу двумерное (плоское) изображение, ибо при любой регулировке такого микроскопа в фокусе всегда будет находиться лишь слой небольшой толщины. Например, при использовании светового микроскопа с иммерсионной системой глубина фокуса составляет всего только 0,25 мкм. Недавно, однако, был изобретен *сканирующий* электронный микроскоп. Эта модификация электронного микроскопа позволяет получать трехмерные изображения поверхностной структуры микроскопических объектов весьма различной величины. Глубина фокуса у этого прибора достигает нескольких миллиметров, а эффективное увеличение может изменяться в пределах от 20 до 10 000. Пример изображения, получаемого с помощью такого прибора, представлен на рис. 2.10.

В таком микроскопе объект, покрытый тонким слоем тяжелого металла, сканируется узким пучком электронов (*электронным зондом*) наподобие того, как это делается в телевизионной трубке (рис. 2.11). Электроны, испускаемые той

точкой объекта, на которую падает сканирующий пучок, собираются коллектором, и с помощью усилителя создается изображение на экране электронно-лучевой трубки. Контраст обусловлен тем, что количество испущенных образцом вторичных электронов пропорционально углу между электронным пучком и поверхностью объекта; это и позволяет выявить пространственную структуру последнего.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Meynell G. G., Meynell E.*, 1965, *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*, New York, Cambridge University Press.
- Norris J. R., Robbins D. W.* (eds.), 1969—1973, *Methods in Microbiology*, London and New York, Academic Press. Исчерпывающий справочник в 7 томах.
- Schlegel H. G.* (ed.), 1965, *Anreicherungskultur und Mutantenauslese (Enrichment Culture and Mutant Selection)*, Stuttgart, Fischer. Единственное в своем роде систематическое описание методов обогащения культур (многие статьи на английском языке).

Обзоры

- Luria S. E.*, 1960, *The Bacterial Protoplasm: Composition and Organization, in the Bacteria*, I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (eds.), Vol. I, p. 1. New York, Academic Press.

3 ПРИРОДА МИКРООРГАНИЗМОВ

Понятие «*микроорганизм*» не имеет точного таксономического смысла, как, например, термины «*позвоночные*» или «*покрытосеменные*». Каждый из таких терминов означает определенную биологическую группу, все члены которой обладают множеством общих структурных и функциональных особенностей. В отличие от этого любой организм микроскопических размеров является по определению микроорганизмом. Микроорганизмы встречаются в самых различных таксономических группах, причем некоторые из этих групп (например, водоросли) включают и гораздо более крупные организмы. В этой главе и двух следующих главах будут рассмотрены две обширные таксономические группы, которые частично или полностью состоят из микроорганизмов, — *прокариоты* и *протисты*.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Клеточные организмы обладают *общностью химического состава*; их наиболее характерная химическая особенность — это присутствие трех классов сложных макромолекул: дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновых кислот (РНК) и белков. ДНК — компонент, несущий в закодированной форме всю наследственную информацию, необходимую для формирования специфических свойств организма. Совокупность этих свойств называют *фенотипом*. Наследственная (генетическая) информация сначала «переписывается» (*транскрибируется*) в виде комплементарных последовательностей в особых молекулах РНК — в так называемых *матричных*, или информационных, РНК (мРНК). Затем молекулы мРНК служат матрицами для синтеза всех специфических белковых молекул, характерных для данного организма (процесс *трансляции*). Трансляция транскрибированной генетической матрицы происходит на органеллах, называемых *рибосомами*, которые состоят из белковых субъединиц и особых молекул РНК — рибосомальных РНК. Молекулы РНК третьего типа — транспортные РНК (тРНК) — участвуют в синтезе белка как переносчики активированных аминокислот, которые собираются в линейную последовательность на первом этапе белкового синтеза. Белки организма — это прежде всего ферменты, катализирующие различные реакции; из белковых молекул строятся также многие виды клеточных микроструктур.

Химические реакции какого-либо организма, катализируемые специфичным для него набором ферментов, в совокупности называются *метаболизмом*. Сюда относятся, во-первых, процессы биосинтеза макромолекул из гораздо более простых химических соединений (питательных веществ), получаемых из внешней среды, и, во-вторых, реакции, необходимые для образования высокоэнергетических (богатых энергией) соединений, обеспечивающих протекание процессов биосинтеза.

Большинство организмов обладает сходной физической структурой: они состоят из микроскопических субъединиц, называемых *клетками*. Все клетки заключены в тонкую оболочку — *плазматическую мембрану*, которая удерживает во внутреннем пространстве множество молекул, больших и малых, необходимых для поддержания биологических функций; в то же время мембрана регулирует прохождение растворенных веществ из окружающего пространства внутрь клетки и обратно. Клетки никогда не возникают *de novo*: они всегда образуются из предсуществующих клеток в результате их роста и деления.

Эти общие положения относятся ко всем живым объектам, за исключением вирусов. Общие свойства вирусов будут описаны в конце этой главы.

ТИПЫ КЛЕТОЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

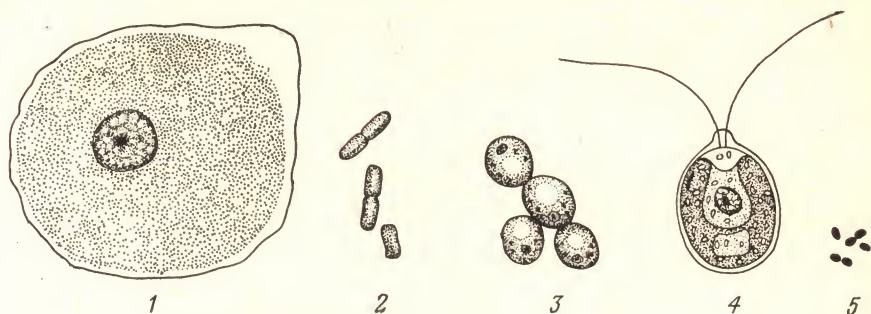
Простейшие клеточные организмы состоят из одной клетки. Поскольку клетки всегда имеют микроскопические размеры, такие *одноклеточные* организмы всегда очень малы и попадают, таким образом, в категорию микроорганизмов. Одноклеточность широко распространена, хотя и не универсальна, среди *бактерий*, *простейших* и *водорослей*; кроме того, одноклеточные организмы встречаются, хотя и реже, среди *грибов*. Весьма значительные различия между разными группами микроорганизмов касаются прежде всего размеров, формы и внутреннего строения клетки; несколько одноклеточных микроорганизмов схематически изображены в одном и том же масштабе на рис. 3.1.

Более сложный тип организации — *многоклеточность*. Хотя многоклеточный организм возникает первоначально из одной клетки, в зрелом состоянии он построен из множества клеток, соединенных между собой характерным образом, что и определяет общую форму всего организма. Многоклеточные организмы, состоящие из небольшого числа клеток, могут еще быть микроскопическими; есть много подобных примеров среди бактерий и водорослей. Такие организмы обычно состоят из однотипных клеток, соединенных в виде цепочки или нити. Однако в тех случаях, когда число клеток значи-

Рис. 3.1. Некоторые одноклеточные микроорганизмы, изображенные в

одинаковом масштабе ($\times 1000$). 1 — амеба; 2 — крупные бактерии; 3 —

дрожжи; 4 — жгутиковая водоросль; 5 — мелкие бактерии.



тельно больше, структура организма может усложняться просто благодаря способу укладки составляющих его клеток. Лучше всего продемонстрировать такую простую многоклеточную организацию на примере некоторых более крупных (в частности, морских) водорослей, которые часто напоминают своей формой высшее растение, хотя составляющие их клетки почти или совсем не специализированы. Форма возникает здесь благодаря определенному плану соединения сходных между собой структурных единиц.

Организации многоклеточных животных и сосудистых растений присуща гораздо большая степень структурной сложности; это результат *дифференциации клеток различного типа* в процессе развития организма. Деление клеток приводит здесь к образованию различных *тканей*, каждая из которых состоит из клеток особого типа. Следующий уровень сложности может быть достигнут благодаря соединению клеток разных типов в функциональные единицы, называемые *органами*. Структурная организация сосудистых растений или многоклеточных животных при микроскопическом исследовании оказывается, таким образом, значительно более сложной, чем организация крупных, но недифференцированных многоклеточных организмов, таких, как морские водоросли.

Наконец, в нескольких группах организмов биологическая организация представлена третьей формой — структурой, которая на первый взгляд противоречит аксиоме, что организмы состоят из клеток. *Ценоцитные* (или многоядерные) организмы не состоят из клеточных субъединиц, отделенных друг от друга мембранами; цитоплазма отдельного организма непрерывна, и он растет, не претерпевая клеточных делений. Этот тип организации характерен для большинства грибов, а также встречается у многих водорослей.

ПРОБЛЕМА ПЕРВИЧНОГО ПОДРАЗДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЗМОВ

Представление о том, что наша планета населена живыми организмами двух различных типов — растениями и животными, — так же старо, как сам человеческий род. На раннем этапе развития биологии это донаучное представление было сформулировано в научных понятиях: биологи выделили два главных царства организмов — растения (Plantae) и животных (Animalia). Организмы, относящиеся к этим двум царствам, легко различить по целому ряду структурных и функциональных признаков; некоторые из этих признаков приведены в табл. 3.1. Это традиционное разделение на две группы было вполне удовлетворительным до тех пор, пока биологам приходилось иметь дело только с наиболее дифференцированными многоклеточными организмами.

ТАБЛИЦА 3.1

НЕКОТОРЫЕ ИЗ ВАЖНЕЙШИХ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ МНОГОКЛЕТОЧНЫМИ ЖИВОТНЫМИ И СОСУДИСТЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Признаки	Сосудистые растения	Многоклеточные животные
<i>Функциональные</i>		
Источник энергии	Свет	Химическая энергия
Источник углерода	CO ₂	Органические соединения
Потребность в факторах роста	Нет	Необходимо много факторов
Активное движение	Отсутствует	Имеется
<i>Структурные</i>		
Клеточная стенка	Имеется	Отсутствует
Хлоропласты	Имеются	Отсутствуют
Характер роста	Неограниченный ¹⁾	Ограниченный ¹⁾

¹⁾ Отдельные особи животных достигают более или менее фиксированных размеров и формы — становятся «взрослыми». У большинства растений рост продолжается в течение всей жизни отдельного организма, и его конечные размеры и форма предопределены в гораздо меньшей степени.

МЕСТО, ЗАНИМАЕМОЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Когда в XVIII—XIX веках началось изучение мира микробов, казалось несомненным, что и эти простые организмы можно распределить между царствами растений и животных. На практике тот или иной организм относили к одному из этих царств обычно на основании двух легко определяемых различий между растениями и животными — способности или неспособности к активному движению и к фотосинтезу. Многоклеточные водоросли — неподвижные фотосинтезирующие

организмы, в некоторых случаях похожие по форме на обычные растения,— были, естественно, отнесены к растительному царству. Ценоцитные грибы, хотя они и не способны к фотосинтезу, были отнесены к царству растений ввиду их неподвижности. Микроскопические подвижные формы были объединены в одну группу животных под названием «инфузорий» (табл. 3.2).

ТАБЛИЦА 3.2

РАННИЕ ПОПЫТКИ (ОКОЛО 1800 Г.) РАСПРЕДЕЛИТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ МЕЖДУ ЦАРСТВАМИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Растения	Животные
Водоросли (неподвижные, фотосинтезирующие)	Инфузории (подвижные)
Грибы (неподвижные, не способные к фотосинтезу)	

Когда была сформулирована и получила признание клеточная теория (около 1840 г.), биологи поняли, что «инфузории» — весьма гетерогенная группа с точки зрения их клеточной организации. Некоторые из этих микроскопических форм (например, коловратки) — многоклеточные беспозвоночные животные; план строения их тела определяется дифференциацией в ходе развития организма. Кроме того, одноклеточные представители «инфузорий» могут быть разделены на две подгруппы: Protozoa (простейшие) с относительно крупными и сложными клетками и Bacteria (бактерии), клетки которых гораздо мельче и проще. Бывшие «инфузории» распались, таким образом, на три группы. Некоторые из них были отнесены к многоклеточным беспозвоночным животным. Другие — простейшие — тоже остались в царстве животных, но были здесь выделены в особую группу на основании их одноклеточного строения. И наконец, бактерии были перенесены в царство растений (несмотря на неспособность большинства их к фотосинтезу), так как выяснилось, что клетки сине-зеленых бактерий (цианобактерий), которых в то время относили к водорослям, обладают сравнительно простой структурой.

Однако последующие наблюдения показали, что отнесение простейших (большой и сложной группы микроорганизмов) к одноклеточным животным приводит к значительным трудностям. Такие простейшие, как ресничные инфузории и амебы, — фаготрофные организмы, лишенные клеточной стенки, — вполне удовлетворительно укладывались в рамки представлений о царстве животных; об остальных простейших этого сказать было нельзя. Например, жгутиковые при ближайшем рассмотрении оказались очень разнородной группой

организмов; у некоторых из них подвижность, обусловленная жгутиками, была единственным признаком, сближающим их с животными. Одни жгутиковые обладали клеточной стенкой, другие — нет. Некоторые были фототрофами, другие же — хемотрофами, а среди последних имелись как осмотрофные, так и фаготрофные организмы. Короче говоря, в этой группе микробов встречались все возможные комбинации признаков, характерных для животных и для растений. Вопрос о положении жгутиковых стал еще более острым, когда было обнаружено, что по особенностям строения клетки многие из прототрофных жгутиковых очень напоминают многоклеточные неподвижные водоросли. Другая группа простейших — миксомицеты — тоже вызывала затруднения. В вегетативном состоянии это фаготрофные амeboидные организмы, но они могут также образовывать сложные плодовые тела, сходные по величине и форме с плодовыми телами истинных грибов. Следует ли относить их к растениям (грибам) или к животным (простейшим)?

В дальнейшем в результате более глубокого изучения особенностей различных групп микробов стало ясно, что на существующем уровне развития биологии уже невозможно логичным и последовательным образом проводить разделение всего живого на два царства. Некоторые группы (в первую очередь миксомицеты и жгутиковые) ботаники считали растениями, а зоологи — животными (табл. 3.3). Эту проблему легко понять с эволюционной точки зрения. Основные группы микробов можно рассматривать как потомков очень древних эволюционных рядов, предшествовавших разделению

ТАБЛИЦА 3.3

ОКОНЧАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ (ОКОЛО 1860 Г.) ПОПЫТОК РАСПРЕДЕЛИТЬ МИКРООРГАНИЗМЫ МЕЖДУ ЦАРСТВАМИ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Растения	Спорные группы	Животные
Водоросли (фотосинтезирующие)		Мелкие многоклеточные Коловратки Нематоды (некоторые) Членистоногие (некоторые) Простейшие Ресничные инфузории
Неподвижные формы	← Фотосинтезирующие жгутиковые →	Жгутиковые, не способные к фотосинтезу
Грибы (не способные к фотосинтезу)		
Истинные грибы	← Миксомицеты →	Амебоидные простейшие
Бактерии		

двух крупных ветвей, которые со временем привели к возникновению растений и животных. Поэтому большинство групп микробов нельзя классифицировать на основе свойств, характеризующих эти две эволюционно более поздние группы.

КОНЦЕПЦИЯ ПРОТИСТОВ

Неудовлетворенность существовавшей классификацией и ясное понимание существа проблемы подсказали одному из последователей Дарвина — Э. Геккелю — очевидный выход из положения: в 1866 г. он высказал мысль, что можно избежать логических затруднений, если признать существование *третьего царства, протистов*, включающего простейших, водоросли, грибы и бактерии. В соответствии с этим среди протистов были и фотосинтезирующие, и не способные к фотосинтезу организмы; некоторые из них были сходны с растениями, некоторые — с животными, а у некоторых сочетались признаки, характерные для обоих традиционных царств. Все протисты отличались от растений и животных *относительно простой биологической организацией*. Многие протисты — одноклеточные или ценоцитные организмы; но даже у многоклеточных протистов (например, у крупных водорослей) нет внутренней дифференциации на различные типы клеток и ткани, характерной для растений и животных. Таким образом, основой для первичного подразделения живых организмов может быть *степень сложности биологической организации*; дальнейшее (вторичное) разделение более высокоорганизованных форм может быть основано на свойствах, которые давно уже использовались для отделения растений от животных (табл. 3.4).

ТАБЛИЦА 3.4

ГРУППЫ, СОСТАВЛЯЮЩИЕ ТРИ ЦАРСТВА ОРГАНИЗМОВ, СОГЛАСНО ПРЕДПОЛОЖЕНИЮ ГЕККЕЛЯ (1866 г.)

Отличительные особенности	Растения	Животные
Многоклеточные; выраженная дифференциация клеток и тканей	Семенные растения Папоротники Мхи и печеночники	Позвоночные Беспозвоночные
• Протисты		
Одноклеточные, ценоцитные или многоклеточные; последние с незначительной дифференциацией клеток и тканей или без нее	Водоросли Простейшие Грибы	

Около 1950 г. развитие электронной микроскопии и методов приготовления биологических препаратов позволило исследовать структуру клеток с разрешением, во много раз превосходящим возможности светового микроскопа. В течение нескольких лет было открыто множество неизвестных ранее особенностей тонкой структуры клетки. Это привело к обнаружению одного принципиально важного признака *внутренней архитектуры клетки*, разделяющего организмы на две группы. В современном мире существует два существенно различных типа клеток. Более сложная *эукариотическая клетка* является структурной единицей у растений, многоклеточных животных, простейших, грибов и всех групп, которые обычно относили к водорослям, кроме одной. Несмотря на крайнее разнообразие эукариотических клеток, обусловленное их специализацией в ходе эволюции этих групп, а также модификациями, которые они претерпевают во время дифференцировки у растений и животных, в основной «архитектуре» таких клеток всегда имеется много общих черт. Менее сложная *прокариотическая клетка* является структурной единицей в двух группах микробов: у бактерий и у тех организмов, которые раньше называли сине-зелеными водорослями. Сине-зеленые водоросли обладают таким же механизмом фотосинтеза, как и эукариотические водоросли, но он находится в клетке, имеющей совершенно иную тонкую структуру. Поэтому объединение так называемых сине-зеленых «водорослей» с эукариотическими водорослями уже нельзя считать оправданным, и они будут рассмотрены в настоящей книге как одна из групп фотосинтезирующих бактерий — *цианобактерии*.

Одновременно с новыми данными о тонкой структуре клетки, получаемыми с помощью электронной микроскопии, быстро накапливались также сведения о функционировании клетки, в значительной мере благодаря развитию молекулярной биологии. Стало очевидным, что структурные различия между эукариотическими и прокариотическими клетками отражают весьма важные различия в механизмах осуществления ряда жизненных функций клетки. Речь идет прежде всего о передаче и проявлении генетической информации, об энергетическом обмене и о механизме поглощения и выделения веществ клеткой. Теперь уже очевидно, что граница между эукариотическими и прокариотическими клеточными организмами — наиболее важное и глубокое из всех обусловленных эволюцией различий в современном мире живого. Кроме того, оно позволяет совершенно однозначно разделить организмы на две группы только по особенностям их клеток.

Эта недавно установленная линия раздела проходит через царство протистов, выделенное Геккелем. Простейшие, гри-

бы и водоросли (за исключением сине-зеленых) — эукариоты, по организации *клетки* они не отличаются существенным образом от растений и животных. Все бактерии (включая цианобактерии) — прокариоты, и такое наименование адекватно определяет эту обширную группу организмов. Протистами же теперь лучше всего называть группу относительно простых эукариот, куда входят простейшие, грибы и водоросли. Это название позволяет отличать их от растений и животных (табл. 3.5).

ТАБЛИЦА 3.5

ПЕРВИЧНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ, ПРИНЯТОЕ
В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ

Эукариоты	Многоклеточные; выраженная дифферен- циация клеток и тка- ней	Растения Семенные Папоротники Мхи Печеночники Животные Позвоночные Беспозвоночные
	Одноклеточные, обра- зующие многоядерные клетки или мицелий; последние с незначи- тельной дифференци- цией клеток и тканей или без нее	Протисты Водоросли Простейшие Грибы
Прокариоты		Бактерии

Ниже будут изложены основные особенности организации и функционирования клеток, отличающие эукариотические клетки от прокариотических.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Как мы уже упоминали, все клетки имеют поверхностную мембрану, называемую *плазматической* мембраной. В электронном микроскопе она выглядит как трехслойная структура толщиной около 8 нм¹. Мембраны с такого рода структурой называют *элементарными мембранами*. Для эукариотической клетки характерно наличие внутри нее множества систем элементарных мембран, причем многие из них по своей структуре и топологии отличны от плазматической мембраны. Эти внутренние мембранные системы служат для обособления

¹ Нанометр (нм) — общепринятая в настоящее время единица длины, которой пользуются при описании тонкой структуры биологических объектов. Он равен 10^{-3} микрометра (мкм) или 10^{-7} см. Ангстрем (А) равен 10^{-1} нм.



Рис. 3.2. Электронная микрофотография тонкого среза плазмоцита кролика; $\times 35\,000$. Виден участок цитоплазмы, заполненный элементами шероховатого эндоплазматического ретикула (ЭР); в поле зрения попала также часть ядра (Я), окруженного ядерной мембраной (ЯМ). (Фото предоставлено д-ром Л. Ж. Шевансом, Институт Пастера.)

Рис. 3.3. Аппарат Гольджи на электронной микрофотографии тонкого среза *Euglena gracilis*; $\times 28\,000$. Два соседних

тельца Гольджи оказались перерезанными в различных плоскостях. Слева виден вертикальный разрез стопки мемб-

ран, справа — разрез, параллельный мембранам в стопке. (Фото предоставлено Г. Ф. Лидейлом.)

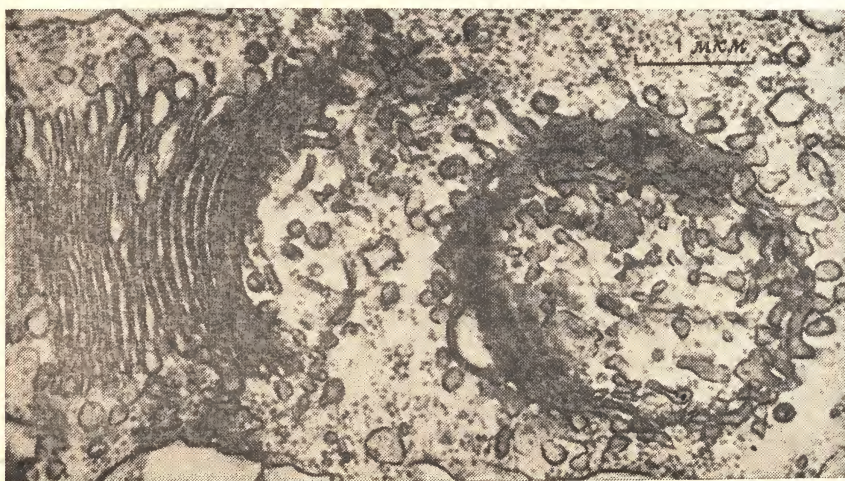


Рис. 3.4. Структура митохондрий, видимая на электронных микрофотографиях тонких срезов эукариотических клеток. А — митохондрии в клетке молочной железы мыши; $\times 56\,000$. Многочисленные кристы (К), образующиеся путем впячивания внутренней мембраны органеллы (стрел-

кой указана наружная мембрана). (Фото предоставлено Дороти Пителка.) Б — митохондрии ресничной инфузории *Condylostoma*; $\times 56\,100$. Многочисленные внутренние мембраны (ВМ) имеют в поперечном разрезе форму трубок. (Фото предоставлено Дороти Пителка.) В — митохонд-

рия фотосинтезирующей жгутиковой водоросли *Euglena*; $\times 65\,450$. Уплотненные впячивания внутренней мембраны (кристы, К) менее многочисленны и не так сильно внедряются внутрь, как на рис. А и Б. (Фото предоставлено Г. Ф. Лидейлом.)

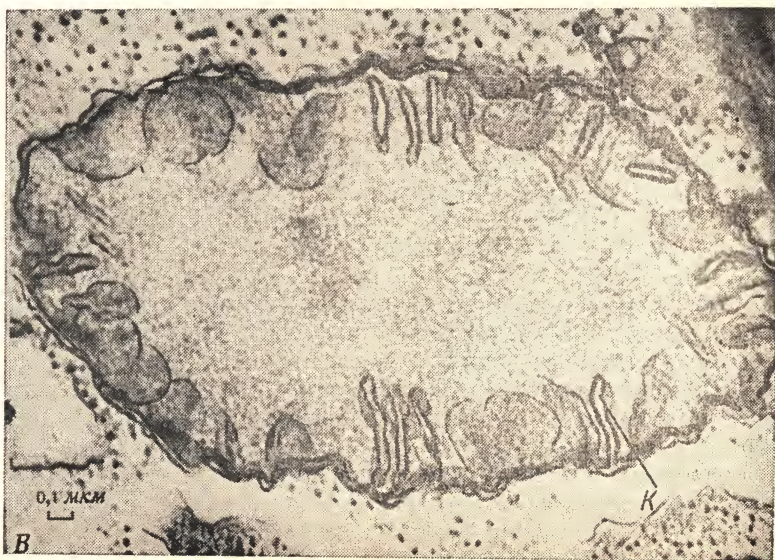


Рис. 3.5. Структура хлоропластов, видимая на электронных микрофотографиях тонких срезов эукариотических клеток. А — хлоропласт одноклеточной водоросли *Euglena*; $\times 21\,200$. Внутренние мембраны (ВМ) уложены параллельно нерегулярными группами вдоль

длинной оси хлоропласта. Рибосомы (Р) беспорядочно разбросаны между группами мембран. Хлоропласт лежит непосредственно под поверхностью клетки (П), обладающей сложной структурой. [Из Leedale G. E., Meeuse B. J. D., Pringsheim E. G., Structure and

spyrogyra, Arch. Microbiology of *Euglena* ol., 50, 68 (1965)]. Б — хлоропласт из листа сахарной свеклы; $\times 14\,840$. Внутренние мембраны в хлоропластах растений образуют регулярно уложенные стопки, называемые гранами (Г). (Фото предоставлены В. М. Летчем.)



ряда функциональных компонентов эукариотической клетки в специализированных и частично замкнутых участках, которые обмениваются веществами главным образом путем мембранного транспорта.

Наиболее сложная по своей топологии мембранная система — **эндоплазматический ретикулум (ЭР)**. Это сложная сеть взаимосвязанных каналов, которые пронизывают значительную часть внутреннего пространства клетки и находятся в непосредственном контакте с двумя другими важнейшими компонентами клетки — с ядром и с некоторой частью цитоплазматических рибосом. Элементы ЭР окружают ядро, образуя **ядерную мембрану**. Ядерная мембрана обладает характерной структурой, в ней имеются многочисленные поры диаметром около 40 нм. Поверхность других участков ретикула, которые называют шероховатым эндоплазматиче-

ским ретикулумом, усеяна рибосомами (рис. 3.2). Белки, синтезируемые на рибосомах шероховатого ЭР, проходят в каналы ЭР и переносятся по ним в другие участки клетки.

Еще одна характерная мембранная органелла — аппарат Гольджи (рис. 3.3), который состоит из плотно уложенных мешочков различной величины. К его многообразным функциям относятся, во-первых, «упаковка» белков и веществ небелковой природы, синтезируемых в эндоплазматическом ретикулуме, и, во-вторых, транспорт этих веществ в другие участки клетки или к ее поверхности, где пузырьки аппарата Гольджи могут сливаться с плазматической мембраной и освобождать свое содержимое, выводя его таким образом из клетки. Этот процесс называется *экзоцитозом*.

Структуры, ответственные за дыхание и фотосинтез (у фотосинтезирующих эукариот), содержатся в органеллах двух функционально различных типов, ограниченных мембранами, — митохондриях (рис. 3.4) и хлоропластах (рис. 3.5). Те и другие содержат систему внутренних мембран с характерной структурой и функцией. Внутренние мембраны митондрий (*кристы*) содержат дыхательную систему — систему переноса электронов; во внутренних мембранах хлоропластов (тилакоидах) находятся пигменты и система транспорта электронов, а также центры фотохимических реакций.

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ГЕНОМ: ЕГО РЕПЛИКАЦИЯ, ТРАНСКРИПЦИЯ И ТРАНСЛЯЦИЯ

В эукариотической клетке ядро служит основным, но не единственным местом хранения наследственной информации. Небольшая в количественном отношении, но функционально очень важная часть клеточного генома находится в митохондриях и в хлоропластах (у фотосинтезирующих организмов). ДНК органелл определяет некоторые (но отнюдь не все) свойства соответствующих органелл. Кроме того, органеллы обоих типов содержат собственные специфические механизмы транскрипции и трансляции. Таким образом, репликация эукариотического генома, так же как транскрипция и трансляция, происходит в двух или трех различных местах: в ядре и цитоплазме, в митохондриях и в хлоропластах. Механизмы репликации, транскрипции и трансляции в органеллах несколько отличаются от соответствующих ядерных механизмов. Поэтому свойства каждой из этих двух систем следует рассмотреть по отдельности.

Репликация, транскрипция и трансляция ядерного генома. У эукариот генетическая информация, содержащаяся в ядре, распределена между ограниченным числом обособленных структурных элементов, называемых *хромосомами*. Каждая хромосома — это нитевидная структура, содержащая ДНК, основные белки особого типа, называемые *гистонами*, и груп-

Рис. 3.6. Интерфазное ядро мышинной клетки, электронная микрофотография препарата, полученного методом замораживания — травления. Пло-

скость скола прошла частично через ядерную мембрану, благодаря чему ядерные поры видны на внутренней (В) и на наружной (Н) поверхно-

сти мембраны; $\times 24\,000$. (Фото предоставлено д-ром Л. Ж. Шевансом, Институт Пастера).

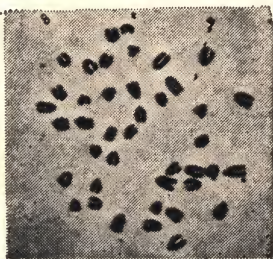


пу негистоновых белков, которые, вероятно, играют какую-то роль в регулировании функции генов. В неделящемся, или *интерфазном*, ядре (рис. 3.6) каждая хромосома сильно вытянута и имеет толщину всего лишь 20—30 нм; поэтому ее нельзя увидеть с помощью светового микроскопа. Интерфазное ядро содержит так называемое *ядрышко* — органеллу, богатую РНК и связанную со специфическим участком хромосомы — *ядрышковым организатором*. Ядрышковый организатор содержит множество копий генов, определяющих структуру рибосомальных РНК; ядрышко служит местом синтеза высокомолекулярной РНК-предшественника, из которой затем путем расщепления образуются основные типы молекул РНК, входящих в состав цитоплазматических рибосом. Эти РНК, а также матричные РНК, синтезируемые в других участках хромосом, выходят через ядерные поры в цитоплазму,

где происходит сборка рибосом и где синтезируется основная масса клеточного белка.

Репликация и распределение генетического материала, содержащегося в хромосомах, связаны со сложным циклическим процессом — *митозом*. Репликация хромосомной ДНК происходит еще до начала митоза в интерфазном ядре. В начале митоза хромосомы спирализуются и образуют компактные структуры, видимые в световой микроскоп. Каждому

Рис. 3.7. Фигура митоза в ядре мышинной клетки. Окрашенный препарат, показывающий расположение хромосом. (Фото предоставлено д-ром Жакобом, Пастеровский институт.)



виду эукариот свойственны определенное число и форма хромосом — набор хромосом в целом определяет *кариотип* данного вида (рис. 3.7). Во время укорочения хромосом в ядерной области происходит быстрая сборка биполярной структуры в форме веретена, состоящей из микротрубочек; ее называют *митотическим аппаратом* (рис. 3.8). Образование этой структуры обычно сопровождается разрушением ядрышка и ядерной мембраны. Хромосомы выстраиваются в экваториальной области веретена, причем каждая хромосома расщепляется вдоль на две идентичные дочерние структуры — *хроматиды*. Затем два набора хроматид расходятся к полюсам митотического аппарата; на полюсах формируются два дочерних ядра, а веретено в это время распадается. Во время последней фазы митоза обычно происходит разделение клетки, причем плоскость деления совпадает с экваториальной плоскостью веретена.

Репликация, транскрипция и трансляция геномов органелл. В хлоропластах и митохондриях ДНК представлена небольшими двухцепочечными молекулами, обычно кольцевыми, и не связана с гистонами (рис. 3.9). Таким образом, генетическая информация органелл содержится в структурах, весьма сходных с хромосомами прокариот, хотя и значительно меньших по размерам. В каждой органелле имеется множество копий ДНК (до 40—50 в некоторых хлоропластах). Кроме того, хлоропласты и митохондрии содержат аппарат транскрипции и трансляции, включая специфические для органелл рибосомы, которые меньше цитоплазматических 80S-рибосом и близки по величине к 70S-рибосомам прока-

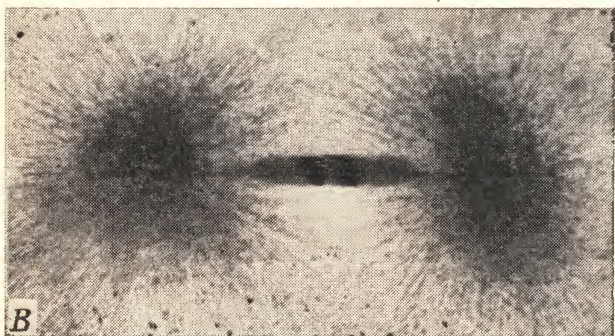
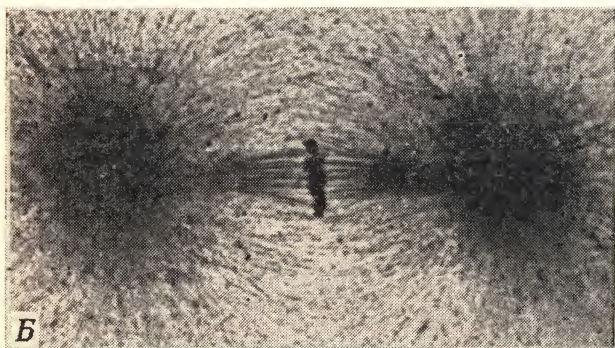


Рис. 3.8. Микрофотографии, иллюстрирующие три последовательные стадии митотического деления ядра. *А* — организация веретена на ранней стадии; ядерная мембрана исчезла, в области формирующегося веретена уже видны хромосомы. *Б* — веретено уже полностью сформировалось, хромосомы выстроились в экваториальной плоскости; эту стадию называют *метафазой* митоза. *В* — происходит разделение двух дочерних наборов хромосом, и каждый набор оттягивается к одному из полюсов веретена.

риот. Синтез белка в органеллах ингибируется хлорамфениколом и некоторыми другими антибиотиками, подавляющими этот процесс и у прокариот, но не влияющими на синтез белка в цитоплазме эукариотической клетки. Таким образом, хлоропласты и митохондрии обнаруживают ряд важных черт фундаментального сходства с прокариотическими клетками. Митохондрии обладают еще одной особенностью, характерной для клеток, но не для других компонентов клетки: они образуются путем деления предсуществующих органелл. Это продемонстрировано также в отношении многих типов хлоропластов у водорослей. У высших растений зрелые хлоро-

Рис. 3.9. Электронная микрофотография кольцевой двухцепочечной молекулы митохондрии

альной ДНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Длина молекулы 9,2 нм; $\times 16\,000$.

(Фото предоставлено д-рами Лазовской и Слонимским.)



пласты развиваются из более простых структур — *пропластид*; на стадии пропластид и происходит воспроизводство этих органелл.

Сходство между этими двумя видами органелл эукариотической клетки и прокариотическими клетками имеет большое значение для представлений об эволюции. Оно наводит на мысль, что хлоропласты и митохондрии отличаются по своему происхождению от других частей эукариотической клетки: возможно, что они произошли от каких-то древних прокариот, которые проникли в эукариотическую клетку как симбионты и в конце концов утратили способность существовать независимо от организма-хозяина (см. гл. 26—28).

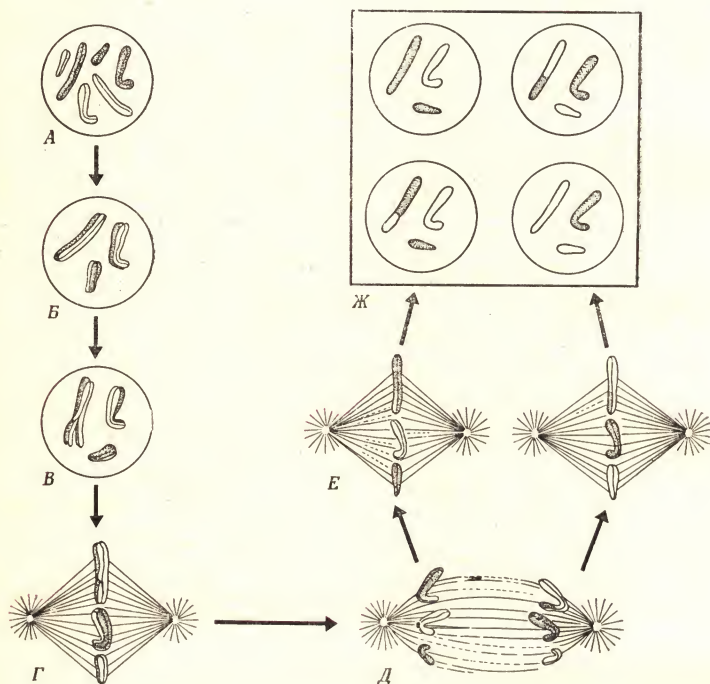
Половой процесс у эукариот. Первый этап *полового размножения* — слияние клеток. Две клетки, участвующие в этом процессе, называются *гаметами*, а образующаяся в результате их слияния клетка — *зиготой*. У всех эукариотических организмов после слияния гамет происходит слияние их ядер, поэтому ядро зиготы содержит *два полных набора генетических детерминантов* — по одному из каждого ядра гаметы.

Половое размножение — обычное явление в жизненном цикле как растений, так и животных. У позвоночных и многих беспозвоночных это *единственный* способ образования новых особей. Растения могут также размножаться бесполом путем (например, отводками); различные способы бесполого размножения встречаются и у многих беспозвоночных животных. У протистов половое размножение редко бывает обязательным этапом жизненного цикла; у многих из них вообще отсутствует половая стадия, и даже у тех видов, у которых она имеется, половое размножение может происходить ред-

Рис. 3.10. Мейоз в гипотетической диплоидной растительной клетке (А) с тремя парами хромосом. Б — гомологичные пары хромосом. В — происходит обмен сегментами (кроссинговер; показано только для одной из

хромосом). Г — хромосомы на стадии «1-й метафазы». Д — хромосомы каждой пары расходятся. Е — образовалось два ядра и в каждом из них метафазное веретено; однако на этот раз расходятся сестринские хрома-

тиды, образующие каждую отдельную хромосому. Эта стадия называется «2-й метафазой», она аналогична митотическому делению. Ж — четыре гаплоидных ядра, образовавшихся в результате мейоза.



ко, а новые особи возникают главным образом бесполым путем (например, путем деления клетки на две или путем образования спор).

Слияние клеток в ходе полового процесса приводит к удвоению числа хромосом, так как ядро каждой из гамет содержит N хромосом, и после их слияния в ядре зиготы будет соответственно $2N$ хромосом. Поэтому при переходе от одного поколения, возникшего половым путем, к следующему на каком-то этапе должна произойти редукция числа хромосом, так как число хромосом в ядре не может бесконечно увеличиваться. Действительно, при половом процессе всегда имеется этап, на котором число хромосом уменьшается в два раза. Это происходит в результате особого клеточного деления, называемого мейозом (рис. 3.10). У животных мейоз происходит непосредственно перед образованием гамет. Ины-

ми словами, в клетках каждой особи данного вида на протяжении большей части жизненного цикла содержится $2N$ хромосом. Такие организмы называют *диплоидными*. Однако это отнюдь не всеобщее правило у эукариот, размножающихся половым путем. У многих протистов мейоз происходит сразу после образования зиготы, так что эти организмы на протяжении большей части жизненного цикла содержат N хромосом. Такие организмы называют *гаплоидными*. У многих водорослей и растений, а также у некоторых грибов и простейших имеется *чередование гаплоидных и диплоидных поколений*. При таком типе жизненного цикла из диплоидной зиготы возникает диплоидная особь, образующая путем мейоза гаплоидные клетки, предназначенные для бесполого размножения. Из каждой такой гаплоидной клетки возникает гаплоидная особь, которая впоследствии образует гаплоидные гаметы; слияние гамет и повторное формирование диплоидной зиготы завершает цикл.

ПЕРЕНОС МАТЕРИАЛА ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ: ЭНДОЦИТОЗ И ЭКЗОЦИТОЗ

Хотя растворенные вещества с небольшими молекулами могут проникать в эукариотическую клетку через ее поверхность мембрану, проникновение более крупных молекул и частиц может происходить совершенно иным способом — путем переноса внутрь небольших капелек, заключенных в мешочек из плазматической мембраны, который затем отрывается от клеточной поверхности и превращается в вакуоль. Самый известный пример этого явления — *фагоцитоз* бактерий или других небольших твердых объектов, осуществляемый фаготрофными простейшими или клетками-фагоцитами многоклеточных животных. Таким же способом в эукариотическую клетку могут проникать капельки жидкости, и этот процесс называется *пиноцитозом*. Фагоцитоз и пиноцитоз объединяют под общим названием *эндоцитоза*. При эндоцитозе большие участки наружной мембраны втягиваются внутрь клетки и образуют стенку вакуоли; потеря вещества плазматической мембраны восполняется путем синтеза соответствующих новых молекул.

Эндоцитоз — чрезвычайно важный биологический процесс, присущий только эукариотам; с него начинается *внутриклеточное пищеварение* (гидролиз биологических макромолекул) и *эндосимбиоз*.

Один из продуктов аппарата Гольджи — окруженные мембраной пузырьки, называемые *лизосомами*. Лизосомы содержат обширный набор гидролитических ферментов, способных расщеплять биологические макромолекулы почти всех типов (табл. 3.6). В норме эти ферменты не действуют на компоненты собственной клетки, так как они отделены лизосомной

мембраной. Однако лизосомы могут сливаться с вакуолями, образовавшимися при эндоцитозе, обеспечивая таким образом гидролиз веществ (или лизис клеток), содержащихся в этих вакуолях; затем растворимые продукты гидролиза диффундируют в окружающую цитоплазму (рис. 3.11). Этот процесс, называемый *внутриклеточным пищеварением*, лежит в основе питания многих простейших и примитивных беспозвоночных. Во всем животном мире он играет защитную роль,

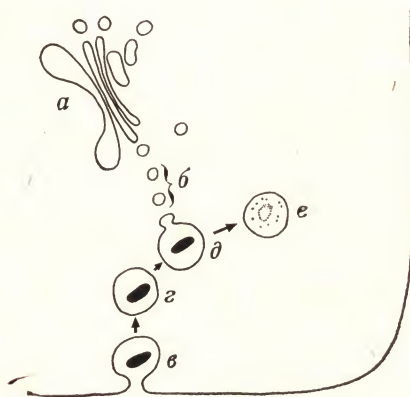


Рис. 3.11. Схема отдельных этапов внутриклеточного пищеварения. *а* — аппарат Гольджи; *б* — лизосомы, образовавшиеся из аппарата Гольджи; *в* — захват частицы пищи (бактерии) путем фагоцитоза у поверхности клетки; при этом частица почти полностью окружается клеточной мембраной; *г* — вновь образованная пищевая вакуоль; *д* — слияние пищевой вакуоли с лизосомой; *е* — переваривание содержимого вакуоли гидролитическими ферментами, освобождающимися из лизосомы. [По Novikoff N., Essner E., Quintana N., Fed. Proc., 23, 1011 (1964)].

обеспечивая возможность разрушать потенциально опасные микроорганизмы, проникшие в жидкости или ткани тела. У позвоночных, у которых переваривание пищи происходит в желудочно-кишечном тракте, вне тканей организма, защитная функция фагоцитоза стала основной.

Во всех главных группах эукариот — у животных, растений и протистов — широко распространено явление внутриклеточного симбиоза (см. гл. 26—28). Чтобы клетки будущих эндосимбионтов получили доступ в цитоплазму клеток-хозяев, они должны пройти в интактном состоянии через плазматическую мембрану клетки-хозяина, а такое проникновение возможно только путем фагоцитоза. При этом после поглощения чужеродной клетки не происходит ее переваривания лизосомами.

Капельки или твердые частицы, состоящие из синтезированных в эукариотической клетке веществ, могут выходить наружу с помощью обратного процесса — *экзоцитоза*. В этом случае ключевую роль играет аппарат Гольджи, так как вещества, предназначенные для экзоцитоза, вначале бывают заключены в пузырьки Гольджи. Таким образом происходит

ТАБЛИЦА 3.6

НЕКОТОРЫЕ ЛИЗОСОМНЫЕ ГИДРОЛАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЫ

Фермент	Субстрат
Рибонуклеаза	РНК
Дезоксирибонуклеаза	ДНК
Фосфатаза	Фосфопротеиды
Катепсин	Белки
Коллагеназа	

секреция ферментов и гормонов специализированными животными клетками; было также показано, что у водорослей процесс образования клеточной стенки включает экзоцитоз мелких фрагментов материала, синтезируемого внутри клетки и переносимого к ее поверхности в пузырьках Гольджи.

СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК

Еще один многофункциональный элемент эукариотической клетки — *микротрубочка*, очень тонкий цилиндр диаметром около 20—30 нм и неопределенной длины. Стенки микротрубочек построены из глобулярных белковых субъединиц с мол. весом от 50 000 до 60 000, способных образовывать упорядоченную структуру.

Микротрубочки служат структурной основой митотического веретена; кроме того, они, видимо, играют какую-то роль в установлении и поддержании определенной формы эукариотических клеток многих типов. В *ресничках* и *жгутиках* таких клеток — органеллах, ответственных за движение, — имеется система регулярно уложенных продольных микротрубочек. Реснички или жгутики заключены в выпячивание плазматической мембраны и содержат набор из 9 пар внешних микротрубочек, равномерно распределенных по окружности вокруг внутренней пары, расположенной в середине (рис. 3.12). Центральные микротрубочки выходят из пластинки, лежащей около поверхности клетки, а наружные пары — из *центриоли* (рис. 3.13), цилиндрического образования, которое тоже состоит из 9 пар микротрубочек.

У некоторых эукариот с центриолями связано также формирование системы микротрубочек митотического аппарата; в этом случае центриоли располагаются на полюсах веретена.

ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ У ЭУКАРИОТ

Большинство свободноживущих микроорганизмов обитает в среде, в которой концентрация воды значительно выше, чем внутри клетки. Поскольку плазматическая мембрана легко

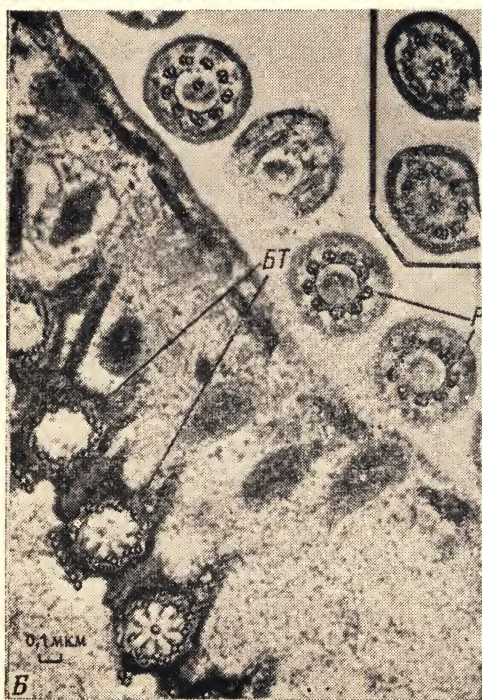
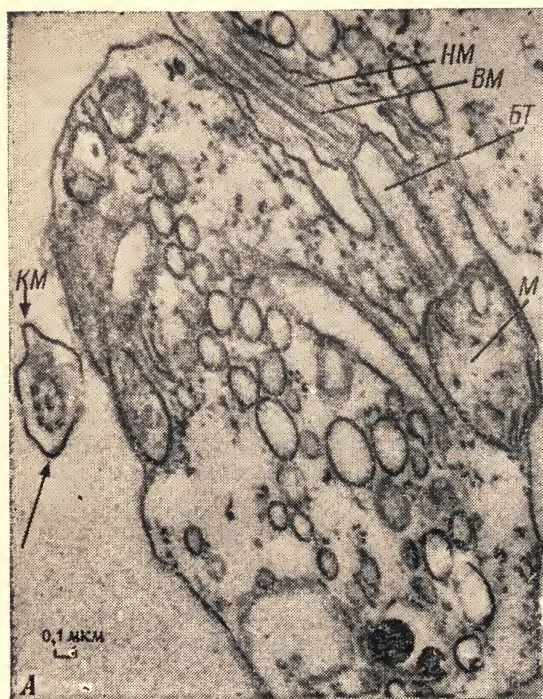
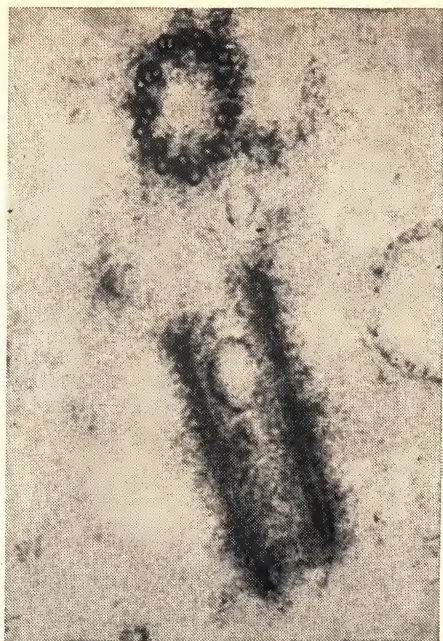


Рис. 3.12. Тонкая структура жгутиков и ресничек эукариот, видимая на электронных микрофотографиях тонких срезов. А — продольный срез через клетку *Bodo* — жгутикового, не способного к фотосинтезу; $\times 38\,000$. Можно видеть цилиндрическое базальное тельце (БТ), наружные микротрубочки (НМ) и внутренние микротрубочки (ВМ). Под базальным тельцем, к которому прикрепляется жгутик, находится специализированная митохондрия (М). Слева (указано стрелкой) поперечный срез жгутика, лежащего вне клетки. Обратите внимание, что жгутик окружен продолжением клеточной мембраны (КМ). Б — срез через поверхность тела ресничной инфузории *Didinium*; $\times 51\,800$. Внутри клетки (слева внизу) видны поперечные разрезы базальных телец (БТ); их стенки состоят из девяти групп микротрубочек, по 3 в каждой группе. Некоторые реснички (Р) были перерезаны. Непосредственно над поверхностью клетки видны девять внешних пар микротрубочек, внутренняя же пара отсутствует. В верхнем правом углу показан срез двух ресничек на некотором расстоянии от поверхности клетки. Здесь можно видеть внутреннюю пару микротрубочек, девять наружных пар и окружающую их мембрану. (Фото предоставлены Дороти Пителка.)

Рис. 3.13. Электронная микрофотография пары центриолей в делящейся клетке лимфосаркомы человека; $\times 104\,000$. Одна из центриолей перерезана поперек, другая вдоль; видна типичная структура этой органеллы в виде пустотелого цилиндра. (Фото предоставлено Ж. Бернхардом, Институт раковых исследований, Вильжуиф, Франция.)



проницаема для воды, но не пропускает многих растворенных веществ, вода стремится войти в клетку; если это стремление не сдерживается каким-нибудь образом, клетка набухает и в конце концов подвергается осмотическому лизису. У многих протистов (водорослей, грибов) опасность осмотического лизиса предотвращается механически, благодаря тому что клетка заключена в жесткую оболочку, способную противостоять давлению воды и предупреждать таким образом лизис клетки. Однако многие простейшие не обладают клеточными стенками; у этих протистов имеется вакуоль особого типа — *сократительная вакуоль*. Это своего рода клеточный насос: она собирает воду в клетке и периодически выбрасывает ее наружу, сливаясь с клеточной мембраной. Работа сократительной вакуоли — еще одна разновидность экзоцитоза, который служит здесь активным механизмом осморегуляции.

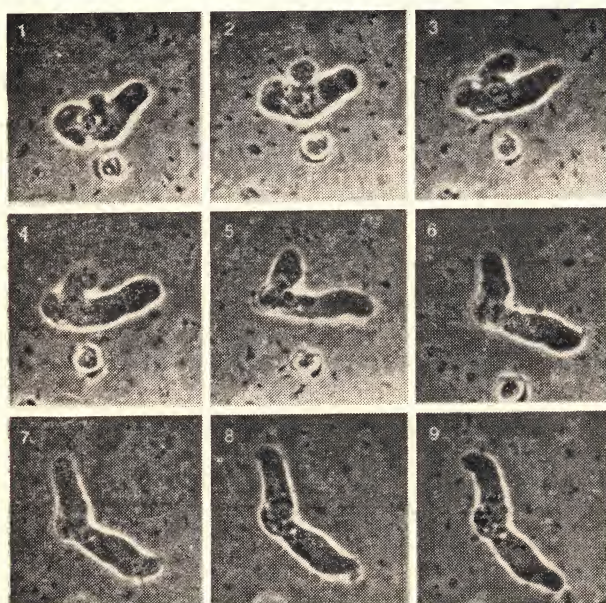
НАПРАВЛЕННОЕ ДВИЖЕНИЕ ВНУТРЕННИХ КОМПОНЕНТОВ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Изучение живых клеток многих типов показывает, что цитоплазма часто находится в активном движении; это явление называется *течением цитоплазмы*. Кроме того, очевидно, что внутриклеточные движения часто бывают строго направленными: индуцируемая светом ориентация хлоропластов, кон-

Рис. 3.14. Амебоидное движение. Серия последовательных микрофотографий небольшой аме-

бы *Tetramitus*, сделанных в условиях фазового контраста с интервалами 15 с: $\times 9,900$. (Фото

предоставлены Жанной С. Пойндекстер.)



центрирование митохондрий клетки в одном месте, работа аппарата Гольджи при внутриклеточном транспорте веществ, упакованных в пузырьках, движение хромосом во время митоза — вот лишь некоторые примеры явлений, связанных с точной регуляцией взаимного расположения различных компонентов клетки.

У многих протистов, не имеющих клеточной стенки, направленное течение протоплазмы может служить механизмом перемещения клетки по твердому субстрату; эта форма движения характерна для амебоидных клеток (рис. 3.14).

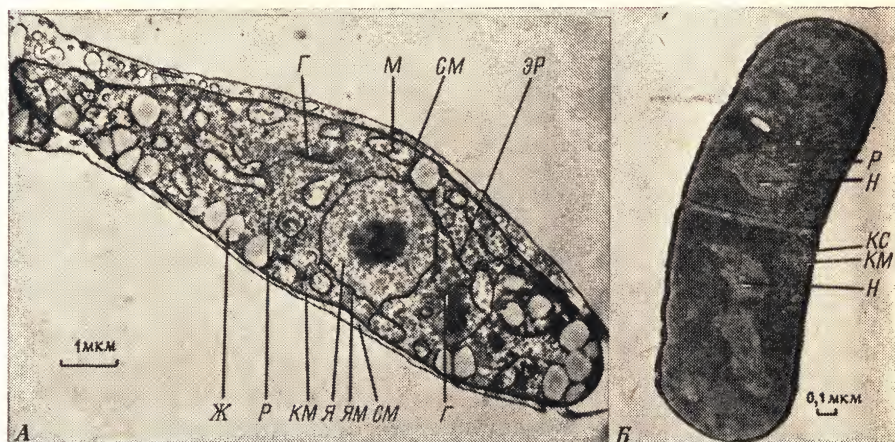
ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Одна из наиболее поразительных особенностей прокариотической клетки — *отсутствие внутренней компартментализации, создаваемой системами элементарных мембран* (рис. 3.15). Плазматическая мембрана у подавляющего большинства прокариот — единственная мембранная система клетки. Однако топология этой системы часто сложна, так как складки мембраны проникают глубоко в цитоплазму. Насколько известно, цианобактерии — единственное исключение из того пра-

Рис. 3.15. Электронные микрофотографии тонких срезов двух одноклеточных микроорганизмов, неспособных к фотосинтезу. Можно видеть различие в сложности внутреннего строения эукариотической и прокариотической клеток. А — протист *Labyrinthula*, эукариотическая клетка которого сравнительно слабо дифференцирована. Б — бактерия *Bacillus subtilis*, структура которой типична для прокариот. Клетка *Labyrinthula* (А)

не имеет стенки, но окружена мягким внеклеточным слизистым матриксом (СМ). Кроме того, видны следующие структуры: эндоплазматический ретикулум (ЭР); тельца Гольджи (Г); митохондрии (М); покоящееся ядро (Я) с плотным ядрышком в центре, окруженное ядерной мембраной (ЯМ); свободные 80S-рибосомы (Р); крупные капельки жира (Ж); клеточная мембрана (КМ). Делящаяся клетка *Bacillus subtilis* (Б) име-

ет довольно плотную клеточную стенку (КС), прилегающую снаружи к клеточной мембране (КМ). Внутри клетки нуклеоплазма (Н) отличается своей фибриллярной структурой от цитоплазмы, плотно заполненной 70S-рибосомами (Р). Обратите внимание на отсутствие внутренних систем элементарных мембран. [Фото предоставлены Портером (А) и Робиноу (Б).]



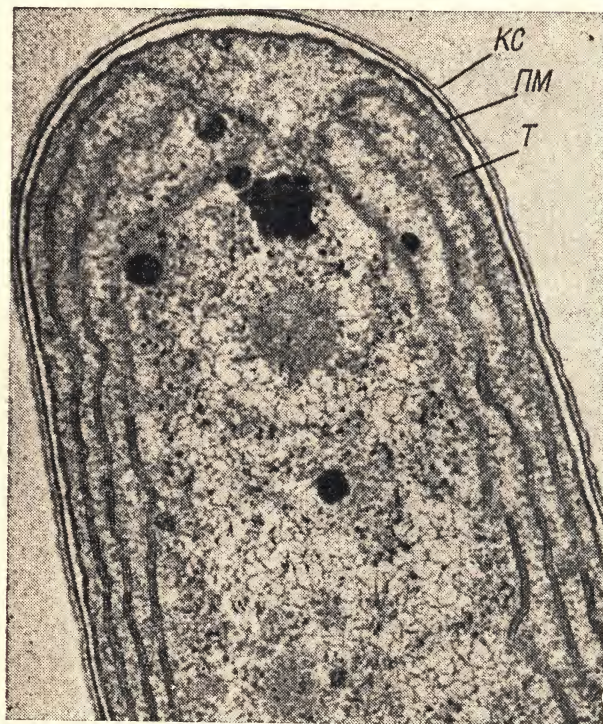
вила, что в прокариотической клетке имеется только одна система элементарных мембран. У этих организмов фотосинтезирующий аппарат находится на уложенных рядами уплощенных мембранных мешках, или тилакоидах, сходных по структуре и функции с тилакоидами хлоропластов. Однако у цианобактерий тилакоиды не заключены в особую органеллу, а лежат непосредственно в цитоплазме (рис. 3.16).

На электронных микрофотографиях большинства прокариот можно видеть внутри клетки только две структурно различающиеся области: цитоплазму и нуклеоплазму (рис. 3.15, Б). Цитоплазма имеет вид мелкозернистой массы, так как содержит рибосомы диаметром около 10 нм каждая. Это всегда так называемые 70S-рибосомы, которые меньше цитоплазматических рибосом эукариот, но сходны по размеру с рибосомами их органелл. Нуклеоплазма имеет неправильные контуры, но она четко отграничена от цитоплазмы, хотя

Рис. 3.16. Электронная микрофотография тонкого среза одноклеточной цианобактерии. Видны клеточная стенка (КС) и клеточная мембрана

(КМ). В цитоплазме находятся тилаконды (Т), содержащие фотосинтезирующий аппарат; они толще клеточной мембраны, так как состоят из

двух плотно прилегающих друг к другу мембран; $\times 53\,000$. (Фото предоставлено д-ром Коэн-Базир.)



эти две области никогда не бывают разделены мембраной. Нуклеоплазма обладает фибриллярной структурой; фибриллы состоят из нитей двухцепочечной ДНК толщиной около 2,5 нм.

Клетки большинства прокариот окружены клеточной стенкой, значительно более толстой, чем мембрана; ее нет только у представителей группы микоплазм.

ФУНКЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Плазматическая мембрана прокариот служит гораздо более избирательным барьером между внутренним пространством клетки и внешней средой, чем мембрана эукариот. Самые крупные частицы, способные проходить через этот барьер, имеют размеры молекул: это фрагменты ДНК (трансформирующая ДНК, см. гл. 15) и белки с относительно низким молекулярным весом (внеклеточные ферменты, секретируе-

мые клеткой, см. гл. 10). Явления экзоцитоза и эндоцитоза совершенно неизвестны у прокариот, даже у тех (группа микоплазм), у которых нет клеточной стенки и поэтому нет механических препятствий для переноса каких-либо частиц или капелек жидкости через поверхность клетки. В результате у прокариот отсутствуют биологические свойства, связанные со способностью к эндоцитозу, в частности способность к внутриклеточному пищеварению и способность иметь клеточных (невирусных) эндосимбионтов.

У многих прокариот плазматическая мембрана играет определенную роль в энергетическом обмене, чего никогда не бывает в клетках эукариот. У аэробных бактерий дыхательная система переноса электронов «вмонтирована» в клеточную мембрану. У эукариот эта часть механизма дыхания находится во внутренней мембранной системе митохондрий. В одной группе фотосинтезирующих прокариот — у пурпурных бактерий — центры фотосинтетической активности тоже вмонтированы в плазматическую мембрану. У пурпурных бактерий и аэробных бактерий, у которых процессы дыхания весьма интенсивны, топология мембраны часто очень сложна: образуются многочисленные впячивания различной формы (пластинчатые или в виде пузырьков), проникающие глубоко в цитоплазму. Эта система намного увеличивает общую поверхность мембраны и, таким образом, позволяет разместить на ней множество центров дыхания (или фотосинтеза).

Есть убедительные данные, что плазматическая мембрана имеет также специальные участки для прикрепления ДНК прокариотической клетки, и именно рост мембраны обеспечивает разделение геномов после завершения их репликации. Это еще одна функция, которую, конечно, никогда не выполняет плазматическая мембрана у эукариот: у них разделение геномов происходит путем митоза.

Следует упомянуть еще некоторые различия между прокариотами и эукариотами в отношении *липидного состава клеточных мембран*. Во-первых, липиды, относящиеся к *стеринам*, обязательно входят в состав клеточной мембраны эукариот, но не содержатся в значительных количествах в клеточной мембране прокариот, за исключением группы микоплазм. Представители этой группы не способны синтезировать эти вещества, но они включают в клеточную мембрану экзогенные стеринны из культуральной среды. Во-вторых, среди жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов всех эукариот, имеются полиненасыщенные кислоты (т. е. жирные кислоты, содержащие более одной двойной связи). У большинства прокариот встречаются только насыщенные или мононенасыщенные жирные кислоты; исключение составляют лишь некоторые цианобактерии, способные синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты.

Наследственная информация прокариотической клетки содержится в нуклеоплазме в структуре, называемой *бактериальной хромосомой*. Это просто двухцепочечная молекула ДНК, которая никогда не связана с основными белками¹ и, как было показано для некоторых прокариот, имеет кольцевую форму. Таким образом, бактериальная хромосома в структурном отношении сходна не с ядерными хромосомами эукариотических клеток, а скорее с ДНК, содержащейся в митохондриях и хлоропластах. Возможно (хотя пока точно не известно), что *вся генетическая информация, определяющая свойства прокариотической клетки, заключена в одной-единственной бактериальной хромосоме* (т. е. в одной очень длинной молекуле ДНК). До сих пор не было обнаружено исключений из этого правила, но число организмов, для которых этот вопрос твердо решен, пока еще невелико. Многие бактерии могут также временно включать небольшие внехромосомные молекулы ДНК кольцевой формы, способные к автономной репликации,— так называемые *плазмиды*. Изученные до сих пор плазмиды несут детерминанты таких фенотипических свойств, как устойчивость к лекарственным веществам и другим антибактериальным препаратам, а также информацию о ферментах некоторых второстепенных метаболических путей. Количество ДНК в плазмиде в 20—1000 раз меньше, чем в бактериальной хромосоме; плазмиды могут быть утрачены клеткой без ущерба для ее жизнеспособности (см. гл. 15).

Мономолекулярная структура бактериального генома согласуется с тем фактом, что общее количество наследственной информации, содержащейся в прокариотической клетке, в среднем на несколько порядков величины меньше, чем в эукариотической клетке. Если выразить размер генома длинной двухцепочечной ДНК, то соответствующие величины для прокариот составят примерно от 0,25 мм (микоплазмы) до 3 мм (некоторые цианобактерии). Наименьшая известная длина гаплоидного генома у эукариот равна 4,6 мм — у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, клетки которых очень просты; у большинства эукариот величина генома по крайней мере на порядок больше. Гаплоидный геном *S. cerevisiae* разделен на 17 хромосом; поэтому среднее количество ДНК в хромосоме здесь очень невелико; оно значительно меньше, чем в единственной хромосоме какого-нибудь прокариотического организма, например *Escherichia coli*.

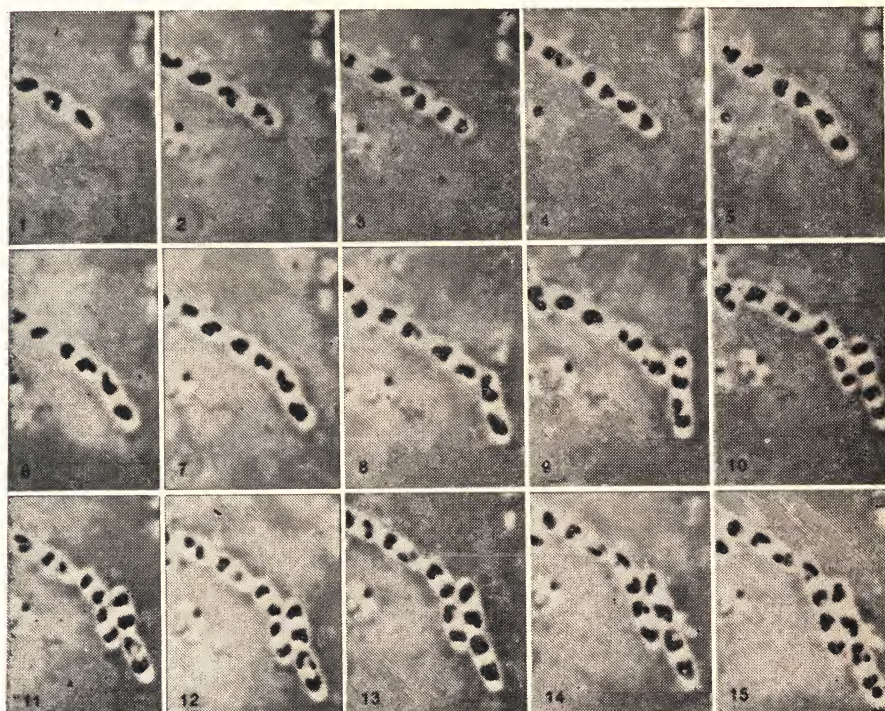
Расхождение геномов после репликации ДНК у прокари-

¹ Судя по новейшим данным, ДНК большинства изученных бактериальных хромосом, возможно, все-таки связана со специфическими основными белками, но их значительно меньше, чем гистонов в эукариотической хромосоме. — *Прим. перев.*

Рис. 3.17. Последовательные микрофотографии, показывающие общий рост и деление ядер в группе клеток *E. coli*, суспендированных в концентрированном белко-

вом растворе для усиления контраста между ядерной и цитоплазматической областями. Фазовый контраст; $\times 975$. Фотографирование производилось на протяжении

78 мин, что соответствует 2,5 бактериальным делениям. (Фото предоставлено Д. Мэйсоном и Д. Пауэлсоном.)

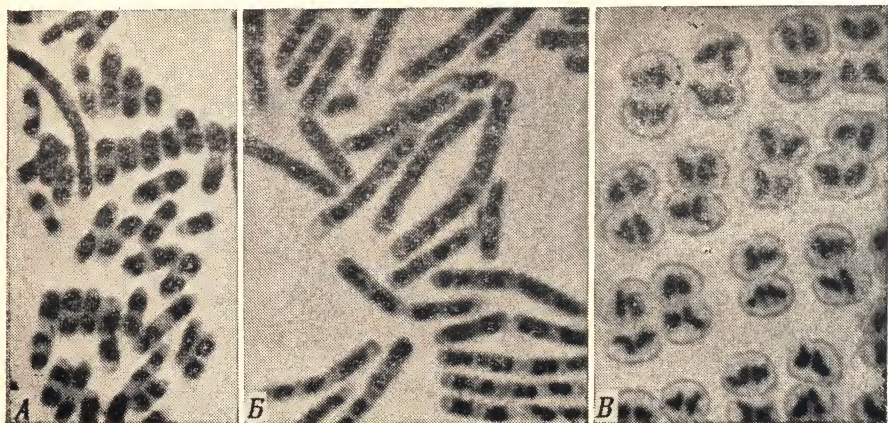


от, очевидно, происходит значительно проще, чем в ядре эукариот, и механизмы этого процесса совершенно различны: у прокариот нет сложной последовательности структурных изменений, сопровождающих митоз. На протяжении клеточного цикла бактериальная хромосома никогда не изменяет своей длины и толщины путем спирализации, а в расхождении дочерних хромосом не участвует система микротрубочек. Вообще микротрубочки, играющие столь многообразную роль в организации и функционировании эукариотической клетки, у прокариот до сих пор не были обнаружены. Механизм расхождения хромосом у прокариот пока еще до конца не изучен, но имеющиеся данные позволяют предполагать, что он включает прикрепление ДНК к специфическим участкам мембраны и что разделение дочерних хромосом происходит благодаря росту мембраны между двумя такими участками.

Рис. 3.18. Препараты бактерий с окрашенными ядерными структурами.

А — *Proteus vulgaris*; $\times 720$. Б — *Bacillus mycoides*; $\times 630$. В — не-

идентифицированные кокки; $\times 850$. (Фото представлены д-ром Робинсу.)



У прокариот процессы расхождения дочерних геномов и клеточного деления не так тесно связаны друг с другом, как в эукариотической клетке, разделение которой обычно начинается на завершающих этапах митоза, а плоскость деления совпадает с экваториальной плоскостью митотического веретена. При быстром росте одноклеточных прокариот деление хромосом обычно опережает деление клеток (рис. 3.17); поэтому сразу после разделения клеток каждая дочерняя клетка содержит две или большее число уже разделившихся бактериальных хромосом (рис. 3.18), и лишь после прекращения роста восстанавливается исходное «однойдерное» состояние клеток.

Большинство прокариот, а возможно и все они, обычно размножаются бесполом путем и существуют в гаплоидном состоянии. Поэтому постоянная диплоидность, характерная для многих групп эукариот и оказавшая глубокое влияние на их эволюцию, не играет никакой роли в эволюции прокариот. Диплоидное состояние может возникать у прокариот на некоторое время в результате генетического переноса, но полная диплоидность достигается лишь редко из-за определенных особенностей механизма этого процесса.

Генетический перенос у прокариот (см. гл. 15) всегда осуществляется путем *однонаправленного* перехода ДНК из клетки в клетку, так что одна клетка служит *донором*, а другая — *реципиентом* ДНК. Этот переход может совершаться при *конъюгации*, включающей прямой контакт двух клеток, или в результате процессов, называемых *трандукцией* и

трансформацией. Трансдукционный перенос происходит при участии некоторых бактериальных вирусов (бактериофагов), способных захватывать фрагменты генома клетки-донора. Трансформационный перенос совершается путем поглощения клеткой-реципиентом свободных фрагментов ДНК, которые выходят из клетки-донора и попадают во внешнюю среду. Как правило, при трансдукции и трансформации переносятся лишь небольшие участки генома. Хотя при конъюгации в принципе возможен перенос всей хромосомы, это случается редко. Поэтому клетка-реципиент обычно становится *частично диплоидной* (меродиплоидной), и при последующей генетической рекомбинации происходят обмены между полным гаплоидным геномом реципиента и частью донорского генома. После рекомбинации обычно быстро восстанавливается гаплоидное состояние в результате элиминации сверхкомплектных генов, не включенных в хромосому реципиента. Возвращение к гаплоидному состоянию не связано, таким образом, с упорядоченным редукционным делением, подобным мейозу у эукариот.

Конъюгация не обязательно включает перенос хромосомных детерминантов: переносимый материал может быть плазмидой. В этом случае после переноса не происходит рекомбинации; плазида, обладающая способностью к автономной репликации, может сохраняться в потомстве клетки-реципиента независимо от хромосомы. Таким образом клетка может приобретать новые генетические элементы, содержащие мало участков, гомологичных каким-то участкам хромосомы, или вовсе не гомологичные хромосоме. Поэтому перенос плазмид может происходить между организмами с сильно различающейся хромосомной генетической конституцией.

ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ У ПРОКАРИОТ

Прокариоты не имеют органелл, выполняющих функцию сократительной вакуоли, и потому не способны активно поддерживать осмотическое равновесие в гипотоничной среде. В связи с этим они могут избежать опасности осмотического лизиса только одним способом — синтезировать достаточно прочную клеточную стенку, способную противостоять тургорному давлению протопласта. Большинство прокариот действительно имеют такую стенку. Хотя химический состав клеточной стенки у прокариот сложен и сильно варьирует в различных группах, в ней почти всегда содержится полимер определенного типа, называемый *пептидогликаном* (или муреином); он-то и обеспечивает главным образом, если не полностью, необходимую механическую прочность. *Способность синтезировать полимер такого типа присуща исключительно прокариотам; это одна из биохимических особенностей, отли-*

чающая прокариот от эукариот. В группах эукариот, обладающих клеточной стенкой (грибы, водоросли, растения), были найдены другие решения проблемы механической прочности; используемые при этом молекулы различны, и нет какого-то определенного полимера, который присутствовал бы во всех типах клеточных стенок эукариот.

Стенка — обязательный структурный компонент клетки во всех основных группах прокариот, кроме микоплазм. Большинство микоплазм — паразиты, которые обычно развиваются в клетках или в жидкостях организма животных или растений; они чувствительны к осмотическому давлению, и их можно выращивать только в высокоосмотических средах. Как мы уже говорили, клеточная стенка у прокариот всегда содержит пептидогликан, однако есть одно исключение — в высокой степени галофильные бактерии из рода *Halobacterium*, которые обычно живут в концентрированных солевых растворах и в соленых озерах. Подобно микоплазмам, эти бактерии чувствительны к осмотическому давлению и быстро подвергаются лизису в разведенной солевой среде.

ДВИЖЕНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Направленное движение цитоплазмы, столь характерное для большинства эукариотических клеток, у прокариот не наблюдается. Поэтому прокариоты, не имеющие клеточной стенки, т. е. микоплазмы, не способны к амебoidalному передвижению, которое свойственно многим протистам-эукариотам, лишенным клеточной стенки. Тем не менее многие прокариоты, обладающие клеточной стенкой, могут активно передвигаться. Одна из разновидностей активного движения — *скольжение* — проявляется только при контакте клетки с твердым субстратом; оно осуществляется без участия каких-либо специальных локомоторных органелл. Скольжение свойственно многим цианобактериям, а также некоторым группам бактерий, не способным к фотосинтезу.

Вторая разновидность движения — активное плавание — свойственно клеткам, находящимся в жидкой среде, и осуществляется с помощью органелл, называемых *жгутиками*. Бактериальный жгутик по своей тонкой структуре и организации совершенно отличен от жгутиков и ресничек эукариот. Это белковая нить, сравнимая по размеру с молекулами (толщиной около 12—18 нм), которая прикрепляется к особой структуре, расположенной под самой мембраной (см. гл. 11); отсюда она проходит наружу сквозь мембрану и стенку. В группе прокариот, называемых спирохетами, за движение клетки ответственна особая сложная органелла — *осевая нить*; она состоит из двух рядов бактериальных жгутиков, лежащих внутри клеточной стенки.

ОРГАНЕЛЛЫ ПРОКАРИОТ, НАХОДЯЩИЕСЯ ВНУТРИ ЦИТОПЛАЗМЫ

В цитоплазме прокариот встречается только один вид органелл, сходный по структуре с органеллами эукариотической клетки; это *тилакоиды* — уплощенные мешки, состоящие из системы элементарных мембран. Тилакоиды содержат фотосинтезирующий аппарат у одной группы фототрофных прокариот — у цианобактерий. Они, по-видимому, гомологичны по строению и функции тилакоидам хлоропластов. Однако в некоторых группах прокариот есть и другие виды своеобразных органелл, хотя они встречаются гораздо реже. Для всех этих органелл характерно отсутствие элементарных мембран: они заключены в однослойную мембрану толщиной всего лишь 2—3 нм. К ним относятся хлоробиум-везикулы — пузырьки, содержащие фотосинтезирующий аппарат зеленых бактерий; газовые пузырьки (аэросомы), придающие плавучесть клеткам различных водных прокариот; карбоксисомы, содержащие главный фермент восстановительного связывания CO_2 — рибулозодифосфаткарбоксилазу — у многих фототрофов и хемоавтотрофов. Их свойства будут подробнее рассмотрены в гл. 11.

МИШЕНИ ДЛЯ НЕКОТОРЫХ АНТИБИОТИКОВ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Антибиотики — это органические вещества микробного происхождения, токсичные для других организмов или подавляющие их рост. Огромная ценность антибиотиков как лекарственных препаратов для лечения инфекционных заболеваний определяется главным образом их избирательной токсичностью, направленной против инфицирующего агента, но не против организма-хозяина. Открытие антибиотиков носило эмпирический характер, и механизмы их действия были выяснены гораздо позже. Сейчас установлено, что избирательная токсичность многих групп антибиотиков обусловлена тем, что их мишенью является структура (или функция), свойственная только прокариотической или только эукариотической клетке; некоторые примеры этого приведены в табл. 3.7.

Пенициллины и некоторые другие антибиотики обладают избирательной токсичностью по отношению к прокариотам, так как они воздействуют на определенные этапы синтеза пептидогликана — компонента клеточной стенки, необходимого для поддержания стабильности клетки у большинства прокариот, но не синтезируемого эукариотами. К этим антибиотикам нечувствительны только две группы прокариот: микоплазмы, у которых нет клеточных стенок, и галофильные бактерии, клеточные стенки которых не содержат пептидогликана.

ТАБЛИЦА 3.7

ГРУППЫ АНТИБИОТИКОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ
НА КЛЕТКИ ПРОКАРИОТ ИЛИ ЭУКАРИОТ

Антибиотики	Механизм действия	Активны против	
		прокариот	эукариот
Пенициллины	Блокируют синтез пептидо-гликанового компонента клеточной стенки	+ ¹⁾	—
Полиеновые антибиотики	Соединяются со стеринами клеточной мембраны; влияют на ее проницаемость	— ²⁾	+
Глутаримиды	Блокируют синтез белков на 80S-рибосомах	—	+
Аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, хлорамфеникол	Блокируют синтез белков на 70S-рибосомах	+	— ³⁾

¹⁾ Кроме прокариот, не обладающих клеточной стенкой (микоплазм).²⁾ Некоторые микоплазмы, включающие в мембрану стеринны из питательной среды, также чувствительны к этим антибиотикам.³⁾ При высоких концентрациях могут влиять на синтез белка в органеллах.

Полиеновые антибиотики (например, нистатин, филиппин и амфотерицин В) связываются со стеринами в клеточной мембране чувствительных организмов, что приводит к разрушению мембраны или к нарушению ее функций и утечке необходимых метаболитов из клетки. Как уже упоминалось (стр. 113), высокое содержание стериннов характерно для мембран эукариотических клеток, но не для мембран большинства прокариот. Поэтому полиеновые антибиотики — агенты, обладающие избирательной токсичностью по отношению к эукариотическим клеткам; единственная группа прокариот, подверженная действию полиеновых антибиотиков, — это микоплазмы, которые способны включать экзогенные стеринны в состав своей клеточной мембраны.

Большое число антибиотиков нарушает определенные этапы синтеза белка, и многие из них специфически подавляют функцию 70S-рибосом, характерных для прокариот, или 80S-рибосом, характерных для эукариот. Глутаримиды (например, циклогексимид) специфически ингибируют синтез белка на 80S-рибосоме и потому избирательно токсичны для эукариот. Аминогликозиды (например, стрептомицин), тетрациклины, хлорамфеникол и макролидные антибиотики (например, эритромицин) специфически подавляют синтез белка на 70S-рибосоме. Таким образом, эти антибиотики избирательно токсичны для прокариот. Поскольку, однако, рибосомы хлоропластов и митохондрий в функциональном отношении сходны с прокариотическими рибосомами, такие антибиотики могут влиять и на синтез белка в органеллах

эукариот. Правда, концентрации антибиотиков, необходимые для заметного подавления белоксинтезирующей активности в хлоропластах и митохондриях, значительно выше концентраций, необходимых для подавления роста бактерий. Возможно, что наружные мембраны этих органелл представляют собой частичный барьер для проникновения антибиотиков внутрь.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ О ПРОКАРИОТАХ И ЭУКАРИОТАХ

Многочисленные и глубокие различия в организации и функционировании эукариотических и прокариотических клеток выявлялись постепенно, и только в последнее время стало ясно все значение этих различий. В настоящее время очевидно, что многие универсальные клеточные функции — передача, транскрипция и трансляция генетического кода, энергетический обмен, поглощение питательных веществ, секреция, движение — осуществляются клетками этих двух типов существенно различным образом. В связи с этим возникает ряд общих вопросов, касающихся эволюции, и в частности первоначального происхождения двух типов клеток и их взаимоотношений. Представляют ли несколько сохранившихся групп относительно простых прокариот ранний этап эволюции гораздо более сложных эукариотических клеток? Или эти два типа клеток имеют совершенно независимое эволюционное происхождение? Заметное сходство между прокариотами и двумя видами эукариотических органелл — митохондриями и хлоропластами — в отношении организации генетического ма-

ТАБЛИЦА 3.8

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ЭУКАРИОТАМИ И ПРОКАРИОТАМИ В ОТНОШЕНИИ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Особенность организации	Эукариоты	Прокариоты
Нуклеоплазма окружена мембраной	+	—
Число хромосом	>1	1 ¹⁾
Хромосомы содержат гистоны	+	—
Имеется ядрышко	+	—
Ядра делятся путем митоза	+	—
В органеллах также присутствует ДНК	+	—
Способы генетической рекомбинации:		
Слияние гамет	+	—
Образование частичных диплоидов при однопавленном переносе ДНК	—	+

¹⁾ Часть генетической информации, несущественной для основных клеточных функций, может содержаться в отдельных генетических элементах (плазмидах).

ТАБЛИЦА 3.9

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ПРОКАРИОТАМИ И ЭУКАРИОТАМИ В ОТНОШЕНИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Структура	Эукариоты	Прокариоты
Эндоплазматический ретикулум	+	—
Аппарат Гольджи	+	—
Лизосомы	+	—
Митохондрии	+	—
Хлоропласты	+	—
Рибосомы	+ или — 80S (в цитоплазме); 70S (в органеллах)	70S
Системы микротрубочек	+	—
Органеллы, окруженные мембраной более простой, чем элементарная мембрана	—	+ или —
Клеточная стенка, содержащая пептидогликан	—	+ или —

ТАБЛИЦА 3.10

НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, СВОЙСТВЕННЫЕ ТОЛЬКО ЭУКАРИОТИЧЕСКИМ КЛЕТКАМ

Фагоцитоз
Пиноцитоз
Секреция веществ в пузырьках Гольджи
Внутриклеточное пищеварение
Возможное наличие клеточных эндосимбионтов
Направленное течение цитоплазмы и амебoidalное движение

териала и аппарата транскрипции и трансляции позволяет сделать еще одно очень интересное предположение, которое уже вызвало много споров: не отличаются ли хлоропласты и митохондрии по своему происхождению от других составных частей эукариотической клетки? Эти два типа органелл могли бы возникнуть из свободноживущих прокариот, обладавших соответственно фотосинтетической и дыхательной функциями и вступивших в эндосимбиотические отношения с примитивными эукариотами; постепенно они могли так тесно интегрироваться с клеткой-хозяином, что в конце концов частично утратили свою генетическую автономию и потеряли способность к независимому существованию.

Некоторые из важнейших различий между эукариотическими и прокариотическими клетками приведены в табл. 3.8—3.10.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ

Представители одного класса микроорганизмов — вирусы — не имеют клеточного строения; они отличаются от клеточных организмов по структуре, химическому составу и способу размножения.

Вирусы — облигатные паразиты, способные развиваться только внутри клеток восприимчивых организмов-хозяев. Хозяевами вирусов могут быть почти все клеточные организмы, как прокариоты, так и эукариоты. Вирусы переносятся из клетки в клетку в виде мельчайших инфекционных частиц — *вирионов*. Вирионы каждого вируса обладают определенными размерами и формой. Каждый вирион состоит из нуклеиновой кислоты, заключенной в белковую оболочку — *капсид*, который построен из определенного числа идентичных белковых субъединиц. Упорядоченная укладка этих субъединиц придает вириону характерную форму. Некоторые вирионы обладают и другими структурами. Многие вирусы, поражающие животных, заключены в липопротеидную мембрану, образующуюся из мембраны клетки-хозяина. Некоторые вирусы прокариот имеют особые белковые «хвостовые» структуры, присоединенные к капсиду, с помощью которых вирион прикрепляется к клетке-хозяину и вводит в нее вирусную нуклеиновую кислоту.

Внутри вириона находится нуклеиновая кислота какого-либо одного типа; в зависимости от вируса это может быть одно- или двухцепочечная ДНК или одно- или двухцепочечная РНК, но во всех случаях она несет генетическую информацию, необходимую для построения вируса, и направляет синтез новых вирионов в зараженной клетке.

Хотя все вирусы зависят в своем развитии от клетки-хозяина, степень и характер этой зависимости могут быть различными. Простейшие вирусы содержат очень мало генетической информации, ее хватает на кодирование в лучшем случае трех белков. В таких случаях генетическая информация и ферментативные механизмы клетки-хозяина играют доминирующую роль в синтезе вируса. Самые крупные вирусы содержат генетическую информацию для кодирования 500 различных белков, в том числе многих ферментов, необходимых для синтеза вируса. Однако во всех случаях клетка-хозяин обеспечивает энергию, низкомолекулярные предшественники белков и нуклеиновых кислот и большую часть белоксинтезирующего аппарата. В результате транскрипции и трансляции вирусного генома активность клетки-хозяина переключается в основном на синтез вирусных компонентов, из которых затем происходит сборка новых вирионов в зараженной клетке. После своего созревания вирионы выходят из клетки, и она обычно погибает. Более подробные сведения о свойствах вирусов читатель найдет в гл. 12.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

DuPraw E. J., 1968, Cell and Molecular Biology, New York, Academic Press.

Knight B. C. J. G., Charles H. P. (eds.), 1970, Organization and Control in Prokaryotic and Eukaryotic Cells, New York, Cambridge University Press.

Novikoff A. B., Holtzmann E., 1970, Cells and Organelles, New York, Holt, Rinehart & Winston.

Обзоры

Lwoff A. (1957), The Concept of Virus, J. Gen. Microbiol., 17, 239.

Stanier R. Y., van Niel C. B., 1962, The Concept of a Bacterium, Arch. Mikrobiol., 42, 17.

4 ПРОТИСТЫ

Среди протистов можно выделить три главные группы: *водоросли*, *простейшие* и *грибы*. Каждая из этих групп очень велика и внутренне разнообразна. Наиболее специализированных представителей, например крупную морскую водоросль, инфузорию или какой-нибудь шляпочный гриб, можно легко отнести к водорослям, простейшим или грибам соответственно. Однако для многих протистов классификация будет произвольной: между водорослями и простейшими, а также между простейшими и грибами существуют многочисленные промежуточные формы. Поэтому между тремя основными группами протистов нельзя провести резкие границы на основе простого набора четких признаков. В общих чертах водоросли можно определить как организмы, осуществляющие фотосинтез с выделением кислорода и обладающие хлоропластами. Многие из них — одноклеточные микроорганизмы, другие — нитчатые, колониальные или ценоцитные формы; третьи в результате развития по экстенсивному многоклеточному типу со слабой или совсем не выраженной дифференцировкой клеток и тканей образуют структуры, сходные с растениями. Таким образом, на организменном уровне водоросли весьма разнотипны, и далеко не все они попадают в категорию микроорганизмов. Бурые водоросли, такие, как ламинарии, могут достигать длины 50 м. Простейшие и грибы — нефотосинтезирующие протисты, и различие между ними касается главным образом структуры организма в целом; простейшие — это в основном одноклеточные формы, тогда как большинство грибов образует разветвленные ценоцитные структуры, растущие в виде нитей и называемые *мицелием*.

Исторические причины, рассмотренные в гл. 3, привели к тому, что водоросли и грибы по традиции относили к «растениям» и изучали их главным образом ботаники, в то время как простейших по традиции считали «животными», и в основном их изучали зоологи. В результате такой специализации имела место тенденция игнорировать многочисленные связи между этими группами. В этой главе мы попытаемся дать единый обзор особенностей различных протистов, чтобы подчеркнуть возможные эволюционные взаимосвязи.

ВОДРОСЛИ

Первичная классификация водорослей опирается на свойства клеток, а не организма в целом. Основой служат такие признаки, как химическая природа клеточной стенки (если

ТАБЛИЦА 4.1
ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Название группы	Пигментная система		Основной материал клеточной стенки	Природа запасных веществ	Число и тип жгутиков (у одной подвижной клетки)	Общая структура организма
	хлорофиллы	Другие специфические пигменты				
Зеленые водоросли (Chlorophyta)	$a + b$	—	Целлюлоза	Крахмал	Обычно два одинаковых жгутика	Одноклеточные; ценоцитные; нитчатые; растениеподобные многоклеточные формы
Эвгленовые (Euglenophyta)	$[a + b]$	—	Клеточной стенки нет	Парамирил и жиры	Один, два или три жгутика	Все формы одноклеточные
Динофлагелляты и родственные формы (Rugophyta)	$a + c$	Особые каротиноиды	Целлюлоза	Крахмал и масла	Два жгутика, различающиеся по форме и положению на поверхности клетки	Главным образом одноклеточные; небольшое число нитчатых форм
Хризофиты и диатомовые (Chrysophyta)	$[a]$ или $a + c$	Особые каротиноиды	Стенка состоит из двух перекрывающихся слоев, содержащих кремнезем (у некоторых стенки нет)	Лейкозин и масла	Два жгутика, расположение их варьирует	Одноклеточные; ценоцитные; нитчатые
Бурые водоросли (Phaeophyta)	$a + c$	Особые каротиноиды	Целлюлоза и альгин	Ламинарин и жиры	Два жгутика различной длины	Растениеподобные многоклеточные формы
Красные водоросли (Rhodophyta)	$a^{(1)}$	Фикобилины	Целлюлоза	Крахмал	Жгутиков нет	Одноклеточные; растениеподобные многоклеточные формы

¹⁾ У некоторых обнаружен также хлорофилл *d*. — *Прим. перес.*

стенка имеется); образуемые клеткой запасные органические вещества; природа фотосинтетических пигментов; строение и расположение жгутиков у подвижных клеток. На основе этих признаков водоросли разбиты на ряд групп, приведенных в табл. 4.1.

Эти группы неравноценны по разнообразию строения их представителей. Например, среди Euglenophyta (эвгленовых водорослей) имеются только одноклеточные или простые колониальные формы, тогда как все Phaeophyta (бурые водоросли) — многоклеточные организмы, внешне сходные с растениями. Самая обширная и разнообразная группа — это Chlorophyta (зеленые водоросли); от нее, по-видимому, произошли высшие растения, и она включает самые различные формы, от одноклеточных организмов до многоклеточных растениеподобных водорослей.

Сходство клеток у всех представителей каждой группы водорослей позволяет предполагать, что при всем возможном разнообразии все они относятся к одной основной эволюционной линии. В целом эволюция водорослей, по-видимому, состояла в *постепенном усложнении организма при значительном различии в организации клетки эукариотического типа*. Эту эволюционную тенденцию можно отметить внутри каждой группы водорослей, однако взаимоотношения между группами остаются совершенно неясными. Поэтому вопрос о происхождении водорослей в целом еще не разрешен.

ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ЖГУТИКОВЫЕ

Простейшими представителями многих групп водорослей являются подвижные одноклеточные организмы, объединяемые под названием *жгутиковых*. Клетка типичного жгутикового — эвглена (*Euglena*), показанная на рис. 4.1, обладает выраженной полярностью: у нее вытянутая листовидная форма, причем жгутики обычно находятся на переднем конце. Euglenophyta, к которым относится эвглена, имеют два жгутика разной длины, выходящих из небольшого углубления на переднем конце клетки. В цитоплазме множество хлоропластов и митохондрий. Вблизи основания жгутикового аппарата находится специализированная органелла — *глазок*, окрашенный в красный цвет благодаря присутствию особых каротиноидных пигментов; глазок служит фоторецептором, он управляет активным движением клетки в зависимости от направления и интенсивности света. У эвглены в отличие от многих других жгутиковых нет жесткой клеточной стенки; на поверхности клетки имеется эластичная пленка, *пелликула*, допускающая значительное изменение формы. Размножается эвглена путем *продольного деления клетки* (рис. 4.2, А). Примерно к началу митоза происходит удвоение ор-

ганелл переднего конца клетки, включая жгутики и их базальный аппарат; последующее расщепление клетки вдоль длинной оси приводит к равномерному распределению дублированных органелл между обеими дочерними клетками. Такой способ деления характерен для всех жгутиковых, кроме представителей Chlorophyta, например *Chlamydomonas*, у которых каждая клетка делится дважды (или большее число

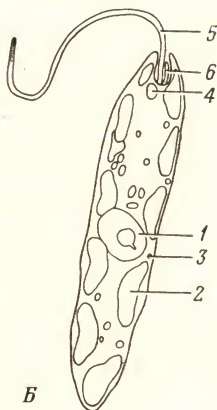


Рис. 4.1. *Euglena gracilis*. А. Микрофотография фиксированной клетки; $\times 1000$. (С разрешения Г. Ф. Лидейла.) Б. Схематическое изображение той же клетки. 1 — ядро; 2 — хлоропласт; 3 — митохондрия; 4 — глазок; 5 и 6 — жгутики неравной длины, выходящие из небольшой полости на переднем конце клетки.

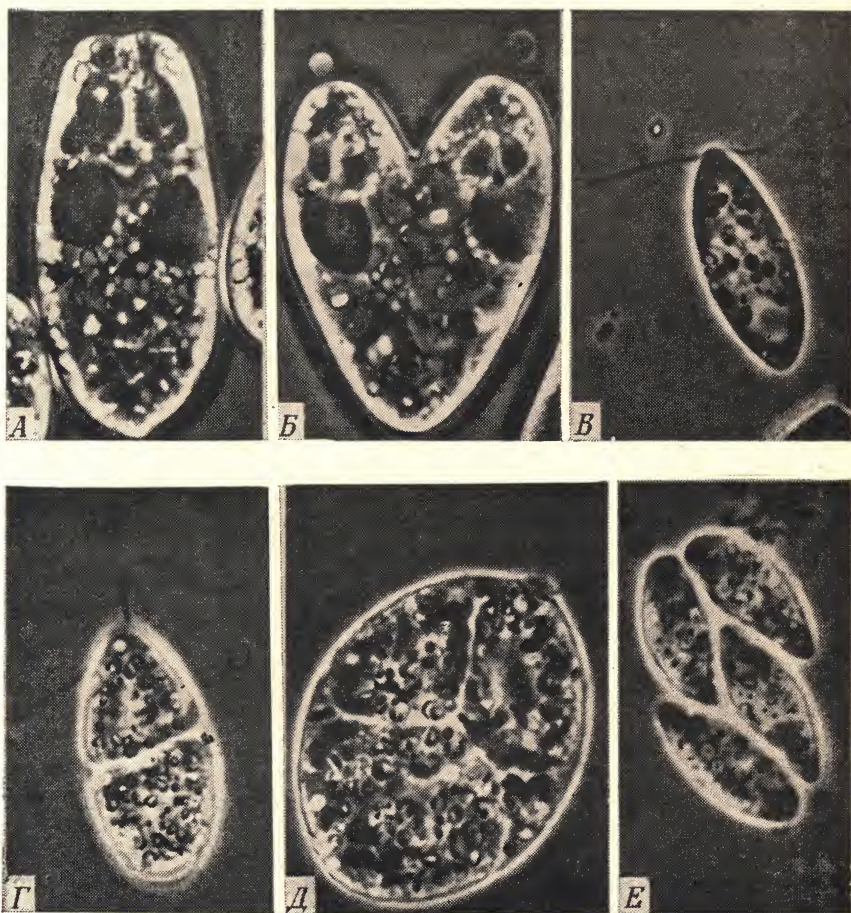
раз) с образованием четырех дочерних клеток меньшей величины, освобождающихся при разрушении клеточной стенки родительской особи (рис. 4.2, Б). Однако и в этом случае внутреннее деление происходит в продольной плоскости. Как мы увидим в следующем разделе, продольное деление встречается также у нефотосинтезирующих жгутиковых простейших и служит одним из главных признаков, отличающих эти организмы от другой большой группы простейших, имеющих жгутикоподобные двигательные органеллы, — от инфузорий.

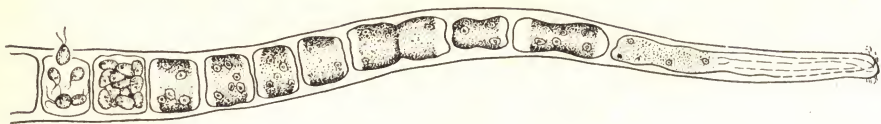
Большинство многоклеточных водорослей в зрелом состоянии неподвижно. Однако при их размножении часто образуются и освобождаются подвижные клетки; это или бесполое репродуктивные клетки (зооспоры), или гаметы. На рис. 4.3 показано освобождение зооспор из клеток *Ulothrix* — нитчатого представителя Chlorophyta; можно видеть, что эти зооспоры по строению очень напоминают клетки *Chlorogonium*, показанные на рис. 4.2, Б. Таким образом, строение подвижных репродуктивных клеток многоклеточных водорослей часто выдает их родство с той или иной группой одноклеточных жгутиковых.

Рис. 4.2. Продольное и множественное деление жгутиковых водорослей. А и Б. Две клетки *Euglena gracilis* в процессе продольного деления (фазовый контраст; $\times 1240$). (Leedale G. F., in The Biology of *Euglena*, D. E. Buetow, ed., New York, Academic Press, 1968.) А — завершилось деление ядра и удвоение

двигательного аппарата на переднем конце клетки; Б — начинается раздвоение клетки. В — Е. Четыре этапа жизненного цикла *Chlorogonium te-tragamum* — зеленой водоросли, размножающейся путем множественного деления (фазовый контраст; $\times 1430$). В — недавно образовавшаяся дочерняя клетка; Г —

двуклеточная стадия; Д — четырехклеточная стадия; Е — четыре дочерние клетки сразу после освобождения из оболочки материнской клетки. (Оригинальные микрофотографии, предоставленные П. Кагреном, кафедрой ботаники Калифорнийского университета в Беркли.)





БЕЗЖГУТИКОВЫЕ ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРΟΣЛИ

Далеко не все одноклеточные водоросли имеют жгутики; некоторые группы водорослей включают представителей, обладающих другими приспособлениями для движения или совсем неподвижных. У многих одноклеточных безжгутиковых водорослей клетки очень сложны и сильно специализированы, что можно видеть на примере двух групп водорослей: десмидиевых и диатомовых.

Десмидиевые, принадлежащие к Chlorophyta, имеют уплощенные, довольно крупные клетки с характерной двусторонней симметрией (рис. 4.4). При бесполом размножении в их экваториальной плоскости образуются две новые полуклетки; впоследствии они разделяются и возникают две билатерально симметричные дочерние клетки, каждая из которых состоит из «старой» и «новой» половинок.

У диатомовых водорослей (рис. 4.5) — представителей Chrysophyta — клеточная стенка состоит из органического вещества, импрегнированного кремнеземом. Ее строение чрезвычайно сложно; она, подобно чашке Петри, всегда составлена из двух перекрывающихся половинок. Деление происходит в продольной плоскости, и каждая из дочерних клеток имеет половину старой клеточной стенки и половину вновь синтезированной.

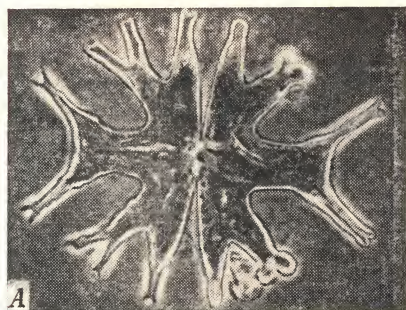
Некоторые десмидиевые и диатомовые водоросли, несмотря на отсутствие жгутиков, могут медленно двигаться по твердому субстрату. Механизм передвижения десмидиевых неизвестен. Перемещение диатомовых водорослей совершается путем амебоидного движения особого типа. У подвижных диатомовых в клеточной стенке есть узкий продольный паз, называемый *швом*, через который протопласт может прямо контактировать с субстратом. Движение осуществляется за счет направленного течения цитоплазмы в канале шва, толкающего клетку по поверхности субстрата.

Поскольку кремневый скелет клеточной стенки практически не разрушается, известно много ископаемых диатомовых (рис. 4.6). В океане диатомовые составляют одну из главных групп водорослей, и во многих местах накапливаются обширные отложения клеточных стенок («раковинок») этих орга-

Рис. 4.4. Фазово-контрастные микрофотографии живых клеток десмидиевых водорослей.

А. *Micrasterias*; $\times 360$.
Б. *Cosmarium*; $\times 1560$.
(Материал предоставлен Р. Берманом, из коллек-

ции водорослей кафедры ботаники Калифорнийского университета в Беркли.)



низмов. Такие отложения, называемые «инфузорной землей», находят промышленное использование в качестве абразивов и фильтрующих материалов.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОДОРосЛЕЙ В ПРИРОДЕ

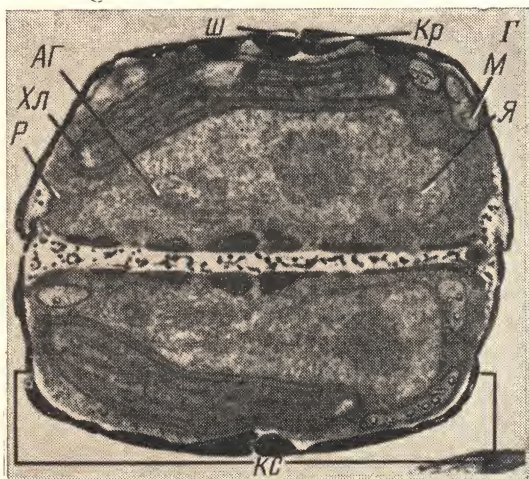
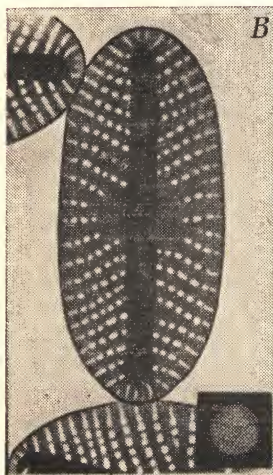
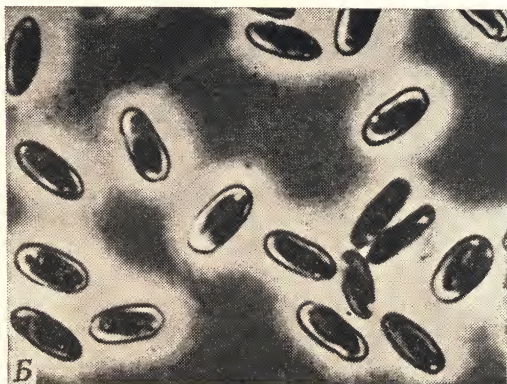
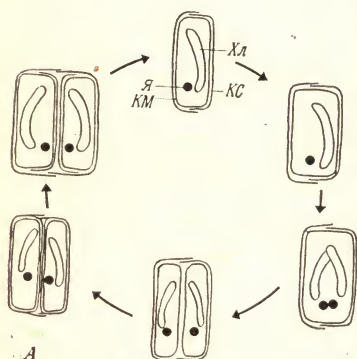
Большинство водорослей — водные организмы, обитающие в пресной или морской воде. В основном это свободноживущие формы, но некоторые одноклеточные морские водоросли вступают в длительный симбиоз с определенными морскими беспозвоночными (например, губками, коралловыми полипами, различными группами морских червей) и развиваются в клетках животного-хозяина. Наземные водоросли растут в почве или на коре деревьев. Некоторые из них вступают в симбиоз с грибами, образуя лишайники — любопытные двухкомпонентные природные ассоциации в виде медленно развивающихся колоний, — в засушливых и неблагоприятных условиях, особенно на поверхности скал. Многие симбиотические отношения, в которые вступают водоросли, будут описаны в гл. 26 и 27.

Морские водоросли играют очень важную роль в кругообороте вещества на Земле, так как их общая масса (и соответственно суммарная фотосинтетическая активность) по меньшей мере равна массе всех наземных растений, а может быть, и намного превышает ее. Эта роль недостаточно очевидна, так как наиболее бросающиеся в глаза морские водоросли — «морская трава» — занимают весьма ограниченную область, прикрепляясь к скалам в приливно-отливной

Рис. 4.5. Диатомовая водоросль *Navicula Pelliculosa*. А. Схема цикла деления. Б. Живые клетки. Фазовый контраст; $\times 1320$. В. Электронная микрофотография клеточной стенки; $\times 9800$.

Внизу справа — тонкая структура одной из стеночных пор; $\times 56\,000$. Г. Поперечный срез делющейся клетки; $\times 23\,800$. Я — ядро; Хл — хлоропласт; М — митохондрия; АГ — аппарат Гольд-

жи; Р — рибосомы; Ш — шов; Кр — кремнезём в стенке; КС — клеточная стенка; КМ — клеточная мембрана. (Фото предоставлены М. Кьяппино и Б. Волькани, Калифорнийский университет в Сан-Диего.)

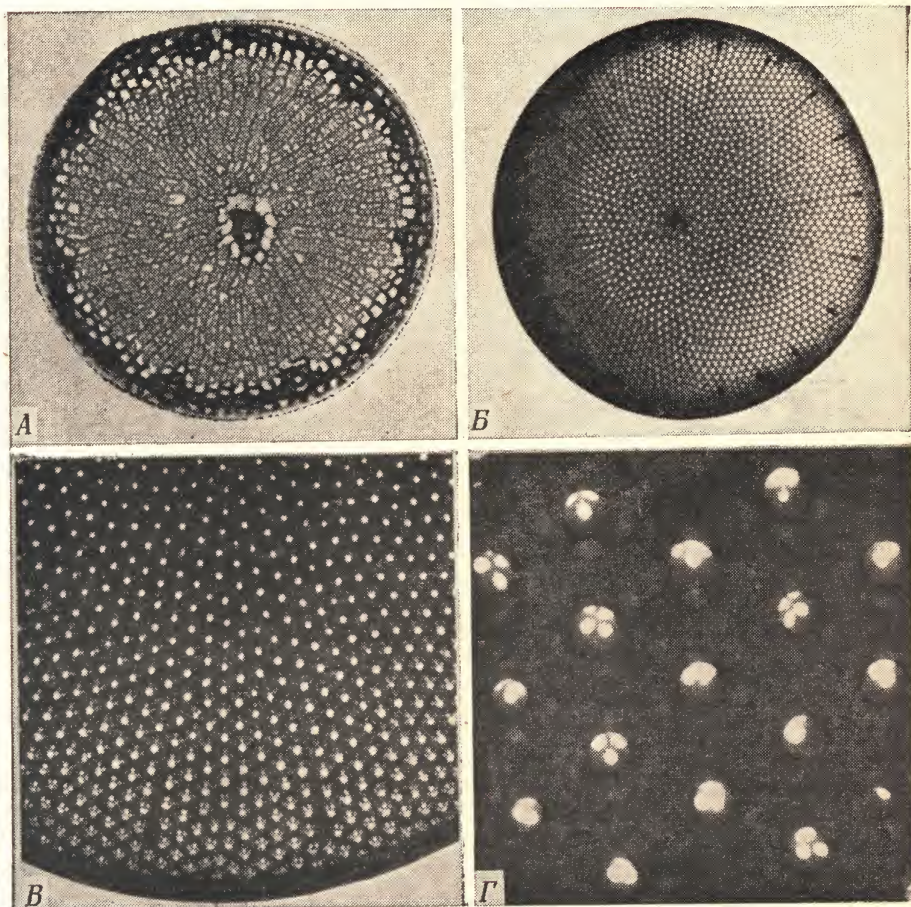


132 зоне и на прибрежных отмелях континентального шельфа. Основная масса морских водорослей — это одноклеточные взвешенные в воде (планктонные) организмы, преимущественно диатомовые и динофлагелляты, распространенные во всех поверхностных водах океанов. Хотя иногда они накапливаются в таком количестве, что отдельные участки моря

Рис. 4.6. Электронные микрофотографии изолированных клеточных стенок диатомовых водорослей, показывающие их сложную структуру. А. Стенка *Cyclotella nana*;

$\times 12\,000$. Б. Стенка *Coscinodiscus granii*; $\times 1370$. В. То же при большем увеличении (3630). Г. То же при еще большем увеличении ($\times 22\,600$); видны детали тонкой струк-

туры пор. (Фото предоставлены М. Кьяппино и Б. Волькани, Калифорнийский университет в Сан-Диего.)



приобретают бурый или красный цвет, обычно плотность популяции настолько мала, что присутствие водорослей незаметно невооруженному глазу. Именно огромный общий объем океанских вод, заселенных водорослями, делает эти организмы наиболее изобильными представителями фотосинтезирующей флоры.

МНОГООБРАЗИЕ СПОСОБОВ ПИТАНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Благодаря способности к фотосинтезу многие водоросли весьма неприхотливы в отношении питания: на свету они могут расти в чисто минеральной среде. Однако дело не всегда обстоит так, поскольку многим водорослям необходимы *специфические витамины*; наиболее обычна потребность в витамине В₁₂. Вероятный источник этих витаминов в природе — бактерии, населяющие ту же среду. Способность к фотосинтезу может не исключать использование органических веществ в качестве основного источника углерода и энергии, так что у многих водорослей *метаболизм смешанного типа*.

Некоторые водоросли (например, зеленая водоросль *Chlamydomonas*), даже развиваясь на свету, не способны использовать СО₂ в качестве основного источника углерода; поэтому для удовлетворения их потребности в углероде необходимо присутствие ацетата или некоторых других подходящих органических соединений. Это обусловлено дефектом фотосинтезирующего аппарата: такие водоросли могут получать за счет фотосинтетической активности энергию, но не способны генерировать восстановитель, необходимый для превращения СО₂ в органические вещества клетки.

Многие водоросли, осуществляющие на свету нормальный фотосинтез с использованием СО₂ в качестве источника углерода, могут хорошо расти в темноте за счет использования различных органических соединений; таким образом, эти формы могут переключаться с фотосинтеза на дыхательный метаболизм, причем это переключение определяется в первую очередь наличием или отсутствием света. Водоросли, полностью защищенные клеточной стенкой, осмотрофны и зависят при темновом росте от присутствия растворенных органических веществ. Однако большое число одноклеточных водорослей, у которых клеточная стенка отсутствует или неполностью одевает клетку, могут использовать и фаготрофный способ питания, поглощая бактерии и другие мелкие микроорганизмы. Поэтому неверно рассматривать водоросли *исключительно* как фотосинтезирующую группу организмов: напротив, многим одноклеточным водорослям доступны также способы питания, характерные для двух главных подгрупп нефотосинтезирующих протистов-эукариот — простейших и грибов.

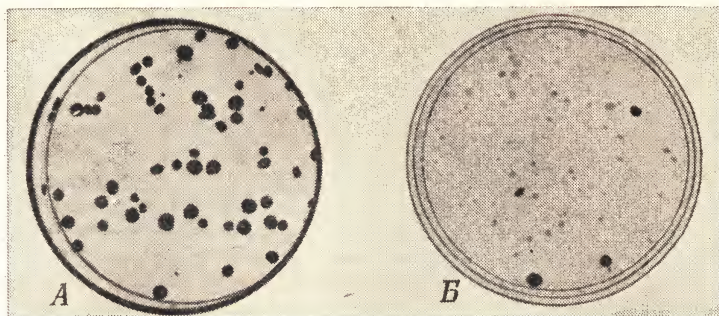
ЛЕЙКОФИТНЫЕ (БЕСЦВЕТНЫЕ) ВОДОРΟΣЛИ

Потеря хлоропластов эукариотической клеткой — *событие необратимое* и ведущее к *полной утрате фотосинтетической способности*. По-видимому, такое изменение многократно происходило в группах одноклеточных водорослей со смешанным типом питания, приводя к возникновению не пигмен-

Рис. 4.7. Потеря хлоропластов *Euglena gracilis* в результате облучения ультрафиолетом. А. Культура, выращенная на свету в чашке

Петри. Б. Культура, выращенная на свету после кратковременного облучения ультрафиолетом. Большая часть клеток дала начало кло-

нам, лишенным хлоропластов (светлые колонии). Фото предоставлены Дж. Шиффом.)



тированных «двойников», которые можно легко распознать по другим клеточным признакам как *нефотосинтезирующие варианты водорослей*. Подобные организмы, называемые *лейкофитами*, имеются во многих группах флагоеллат, а также диатомовых и неподвижных зеленых водорослей. Обычно лейкофиты легко выявляются, так как они сохраняют практически полное структурное сходство с соответствующей фотосинтезирующей формой. В некоторых случаях такая структурная близость может выражаться в сохранении зачаточных, непигментированных хлоропластов, а также пигментированных глазков. Вряд ли можно сомневаться, что эти нефотосинтезирующие организмы — близкие родственники их структурных аналогов среди водорослей и произошли от последних в сравнительно недавнем прошлом в результате потери способности к фотосинтезу. Такой переход может быть даже осуществлен экспериментально у некоторых штаммов *Euglena*, дающих стабильные бесцветные расы при обработке антибиотиком стрептомицином, а также под действием малых доз ультрафиолета или высокой температуры (рис. 4.7). Эти бесцветные расы нельзя отличить от встречающихся в природе нефотосинтезирующих эвгленовых рода *Astasia*.

При классификации лейкофитов возникает трудная проблема. На основе строения клеток они могут быть легко отнесены к соответствующей группе водорослей как ее нефотосинтезирующие представители, и эта классификация, несомненно, наиболее логична. Однако, будучи нефотосинтезирующими одноклеточными протистами-эукариотами, они могут также рассматриваться как простейшие, и зоологи действительно помещают их среди простейших. Таким образом,

лейкофиты — это первый и самый поразительный пример группы или, вернее, целой серии групп организмов, занимающих явно промежуточное положение между двумя основными категориями эукариотических протистов.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ПРОСТЕЙШИХ

Простейшие — чрезвычайно разнообразная группа одноклеточных нефотосинтезирующих протистов, большей частью не имеющих очевидного сходства с какими-либо водорослями. Вместе с тем существование различных лейкофитов, для которых можно признать происхождение от водорослей, дает правдоподобные указания на эволюционную природу многих групп простейших. Потеря фотосинтетической функции резко снижает возможности питания организма, поэтому лейкофиты ограничены более узким кругом условий, чем их фотосинтезирующие предки. Специализированные структуры клетки, имевшие адаптивное значение при фотосинтетическом метаболизме, становятся излишними (наиболее яркий пример — глазок). Поэтому можно предположить, что потеря способности к фотосинтезу сопровождалась рядом эволюционных изменений в структуре клетки в сторону лучшего соответствия организма осмотрофному или фаготрофному образу жизни. В какой-то момент эти изменения зайдут так далеко, что уже нельзя будет распознать природу организма, и его без колебаний будут относить к простейшим.

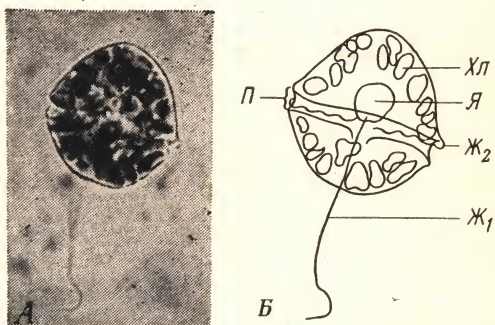
У одной из групп протистов — у динофлагеллят — есть ряд характерных особенностей строения клетки, позволяющих биологу распознать динофлагеллятную природу даже тех организмов, которые очень далеко эволюционировали от типичных одноклеточных, способных к фотосинтезу и обладающих жгутиками представителей этой группы водорослей (рис. 4.8). Подвижные клетки динофлагеллят имеют два жгутика, различающиеся по строению и расположению. Один из них лежит в желобке пояса по экватору клетки, а другой отходит далеко от клетки и направлен назад. Ядро у динофлагеллят также необычно; его деление весьма специализировано, и хромосомы остаются видимыми в интерфазе.

Большинство фотосинтезирующих динофлагеллят — одноклеточные планктонные организмы, широко распространенные в океанах и имеющие характерный бурый или желтый цвет благодаря наличию определенного набора фотосинтетических пигментов. Многие (так называемые «панцирные») динофлагелляты обладают весьма сложными клеточными стенками, состоящими из нескольких пластинок, не полностью покрывающих протопласт. У фотосинтезирующих представителей этой группы существует достаточно выраженная тенденция к фаготрофному питанию, так как строение клеточной стенки позволяет выпускать псевдоподии и захватывать

мелкую добычу. В некоторых нитчатых водорослях, полностью одетых клеточной стенкой, можно распознать потомков динофлагеллят по строению зооспор с их характерным расположением жгутиков.

Значительно большее разнообразие специализированных форм можно найти среди нефотосинтезирующих представителей этой группы жгутиковых. Многие свободноживущие одноклеточные динофлагелляты — нефотосинтезирующие фа-

Рис. 4.8. Фотосинтезирующая динофлагеллята *Glenodinium foliaceum*. А. Живая клетка; $\times 1000$. Б. Схематическое изображение клетки. Я — ядро; Хл — хлоропласт; П — пояс; Ж — жгутики.



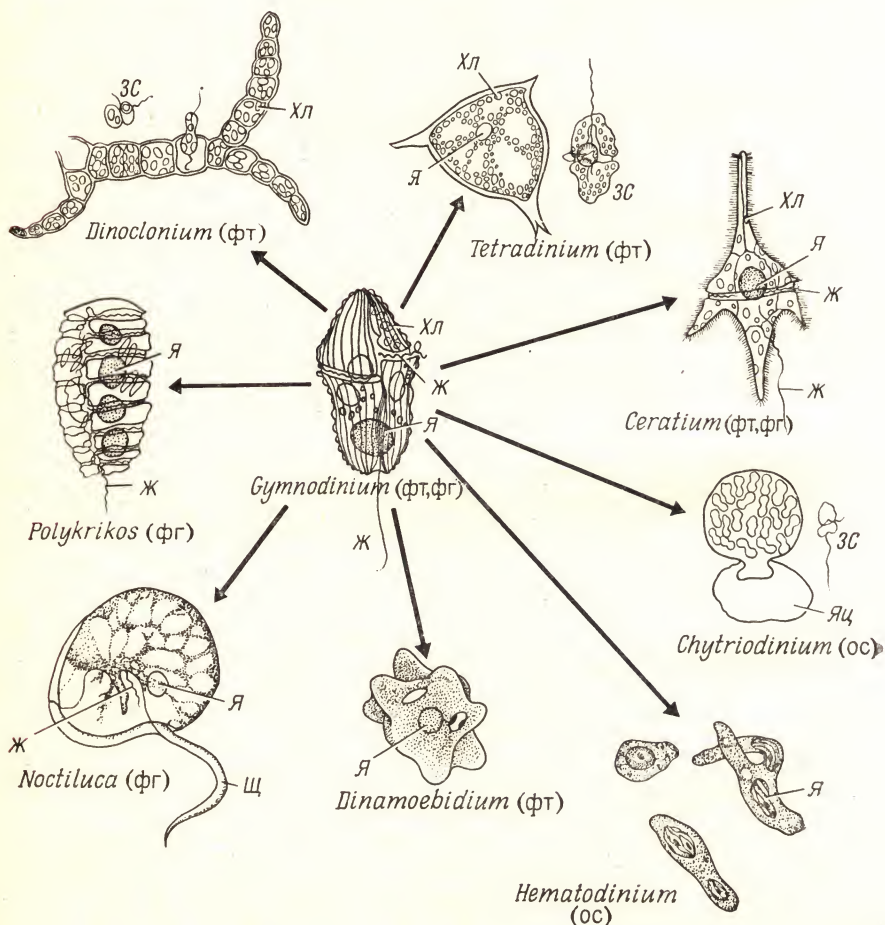
готрофные организмы. Некоторые из них сохраняют близкое структурное сходство с фотосинтезирующими представителями этой группы; другие, как, например, крупный морской организм *Noctiluca*, обладают весьма своеобразной клеточной организацией, какой нет ни у одного из фотосинтезирующих представителей этой группы. Однако наибольшие модификации строения клетки встречаются у паразитических представителей (это в большинстве своем паразиты морских беспозвоночных). *Hematodinium*, найденный в крови некоторых крабов, полностью лишен жгутиков. *Chytriodinium*, паразитирующий на яйцах веслоногих рачков, развивается в яйце в виде крупного мешковидного образования, которое затем в результате множественного внутреннего деления производит многочисленные подвижные споры с типичным для динофлагеллят строением. Если бы не сохранение характерной организации ядра (а в случае *Chytriodinium* — спор), то ни один из этих паразитических протистов не мог бы быть отнесен к одной группе с фотосинтезирующими динофлагеллятами. *Hematodinium* можно было бы отнести к споровикам (простейшие), а *Chytriodinium* — к примитивным грибам, известным под названием хитридиевых.

Таким образом, в пределах одной этой небольшой группы жгутиковых можно воссоздать основные черты эволюционной картины, характерной, по-видимому, для протистов в целом (рис. 4.9).

Рис. 4.9. Различные пути эволюции динофлагеллят. *Gymnodinium* — относительно неспециализированная форма, способная как к фототрофному (фт), так и к фаготрофному (фг) питанию. *Ceratium* — более специализированный фототрофный организм с очень сложной клеточной стенкой, покрытой шиповидными выростами, составленными из множества пластинок. *Tetradinium* и *Dinoclonium* — неподвижные облигатные фо-

тотрофы, размножающиеся множественным делением с образованием типичных для *Dinoflagellata* зооспор. *Polykrikos*, *Noctiluca* и *Dinamoebidium* — свободноживущие фаготрофные формы. *Polykrikos* — ценоцитный (многоядерный) организм, клетки которого имеют несколько пар жгутиков; у *Noctiluca* один маленький жгутик и большой щупалец; *Dinamoebidium* — амебонидный организм. *Chytridinium* и *Hemato-*

dinum — паразитические формы с осмотротфным (ос) типом питания. *Chytridinium* паразитирует на яйцах беспозвоночных и размножается зооспорами динофлагеллятного типа, освобождающимися при разрыве большой мешковидной структуры. *Hematodinium* — кровяной паразит крабов. Я — ядро; Хл — хлоропласт; Ж — жгутик; Щ — щупалец; ЗС — зооспора; Яц — пораженное паразитом яйцо беспозвоночного животного.



ПРОСТЕЙШИЕ (PROTOZOA)

В свете предыдущего обсуждения лучше всего будет рассматривать простейших как объединение ряда групп нефотосинтезирующих, в типичном случае подвижных, одноклеточных протистов, которые, по-видимому, произошли на различных этапах эволюции от той или иной группы одноклеточных водорослей (табл. 4.2).

ТАБЛИЦА 4.2
ОСНОВНЫЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЯ ПРОСТЕЙШИХ

I. Класс Mastigophora	Жгутиковые простейшие. Подвижность обусловлена одним или несколькими жгутиками. Клетки всегда делятся в продольном направлении. К этому классу относятся «Phytoflagellata» (т. е. одноклеточные подвижные представители различных групп водорослей) и «Zooflagellata» — нефотосинтезирующие организмы, не принадлежащие к лейкофитам. В основном осмотрофные формы.
II. Класс Rhizopoda	Амебонидные простейшие. Передвигаются при помощи псевдоподий. (Следует отметить, что отграничение от класса I, основанное на способе движения, не является абсолютным, так как многие Rhizopoda тоже имеют жгутики). Размножаются бинарным делением. Фаготрофы.
III. Класс Sporozoa	Очень разнообразная группа паразитических простейших. Неподвижны или способны к скользящему движению. Размножаются множественным делением. Осмотрофы. Некоторые примеры рассмотрены в гл. 30.
IV. Класс Ciliata	Инфузории. Подвижность обусловлена многочисленными ресничками, образующими координированную двигательную систему. В клетке два ядра, различающиеся по структуре и функции. Деление всегда поперечное. Фаготрофы.

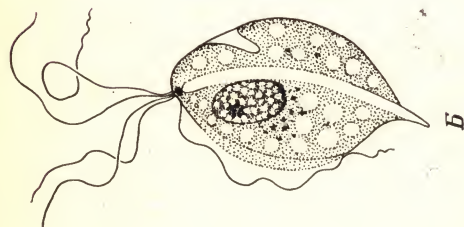
ЖГУТИКОВЫЕ ПРОСТЕЙШИЕ (MASTIGOPHORA)

У Mastigophora двигательной органеллой всегда служат жгутики. В отличие от инфузорий, делящихся в поперечной плоскости, жгутиковые простейшие претерпевают продольное деление, которому предшествует удвоение жгутикового аппарата на переднем конце клетки. Такой способ деления уже был описан для фотосинтезирующего жгутиконосца *Euglena*. Кроме лейкофитов, эта группа простейших включает многих

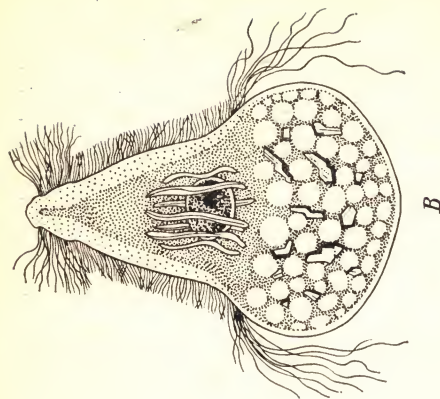
Рис. 4.10. Некоторые нефотосинтезирующие жгутиковые простейшие (*Maстиgophora*). А. Трипаносома, для которой характерна клетка листовидной формы и длинная ундулирующая мембрана, к которой присоединен жгутик. В. *Trichomonas*. В. *Trichonympha*.



А



В

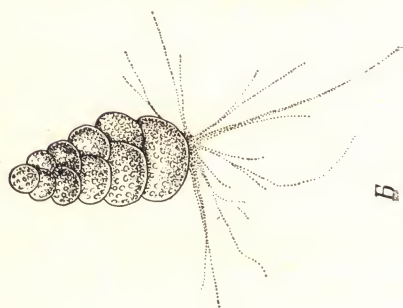


В

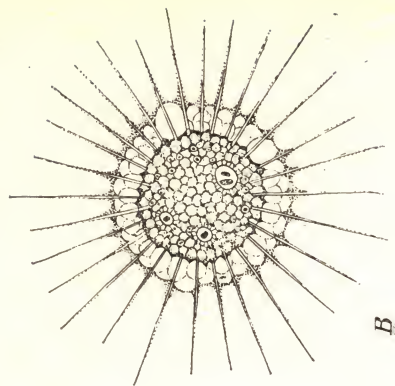
Рис. 4.11. Некоторые амебодные простейшие (*Sarcodina*). А. Амеба. В. Фораминифера; обратите внимание на многокамерную раковинку, из которой выступают псевдоподии. В. Солнечник.



А



В



В

ющих жгутиковых; большей частью это паразиты животных.

Трипаномы часто паразитируют у позвоночных, у которых они развиваются в кровяном русле и передаются новому хозяину при укусе насекомых. К ним относятся известные патогенные организмы, например возбудитель африканской сонной болезни, переносимый мухой це-це. Его тонкая листовидная клетка снабжена всего лишь одним жгутиком, проксимальная часть которого прикреплена к телу клетки и образует ундулирующую мембрану (рис. 4.10, А). Трипаномы — осмотрофные простейшие, поглощающие питательные вещества из крови хозяина.

Другие паразитические жгутиковые живут в кишечнике у позвоночных или беспозвоночных. Трихомонады, имеющие от 4 до 6 жгутиков (рис. 4.10, Б), являются безвредными обитателями кишечника позвоночных. Несколько весьма специализированных групп жгутиковых простейших обитают в кишечнике термитов (один из самых замечательных представителей, *Trichonympha*, показан на рис. 4.10, В).

АМЕБОИДНЫЕ ПРОСТЕЙШИЕ (PHIZOPODA)

Это те простейшие, у которых преобладает амебоидный способ передвижения, хотя некоторые из них способны также образовывать жгутики. Наиболее простые представители этой группы — амебы; клетки их в результате непрерывного вытягивания псевдоподий все время изменяют свою форму. Большинство амоб — свободноживущие почвенные или водные организмы, фагоцитирующие более мелкую добычу. Немногочисленные формы, в том числе возбудители амобной дизентерии, обитают в кишечнике животных. У других представителей Rhizopoda клетка имеет вполне определенную форму в результате образования наружного скелета или раковинки (что характерно для фораминифер) либо внутреннего скелета (у солнечных и радиолярий). Некоторые представители этой группы простейших показаны на рис. 4.11.

ИНфузОРИИ (CILIOPHORA)

Инфузории — очень большая и разнообразная группа водных фаготрофных организмов, широко распространенных в пресной воде. Они обладают рядом существенных клеточных признаков, резко отличающих их от всех других протистов. По-видимому, эта группа, несмотря на ее весьма значительное внутреннее разнообразие, имеет единое эволюционное происхождение.

Общие признаки инфузорий можно резюмировать следующим образом:

1. В какой-то период жизненного цикла клетка движется с помощью многочисленных коротких волосовидных вы-

ростов, гомологичных жгутикам и называемых *ресничками*.

2. Каждая ресничка берет начало от базальной структуры — кинетосомы, которая гомологична кинетосоме жгутика; однако у инфузорий кинетосомы связаны между собой пучками фибрилл, называемых *кинетодезмами*, так что образуются очень сложные двигательные структуры — *кинетии*. Эта внутренняя система сохраняется даже у клеток, утративших реснички.
3. Клетка делится в поперечном направлении, а не в продольном, как у жгутиковых. Инфузории обладают выраженной полярностью с дифференциацией клетки на заднюю и переднюю части, так что поперечный способ деления влечет за собой необходимость сложного морфогенетического процесса: во время каждого деления «передняя» дочерняя клетка ресинтезирует структуры задней части, а «задняя» — структуры передней части. Обычно морфогенетические перестройки почти завершаются к моменту разделения двух дочерних клеток.
4. Каждая особь имеет два различных ядра: большой *макронуклеус* и значительно меньший *микронуклеус*, которые различаются как по структуре, так и по функции.

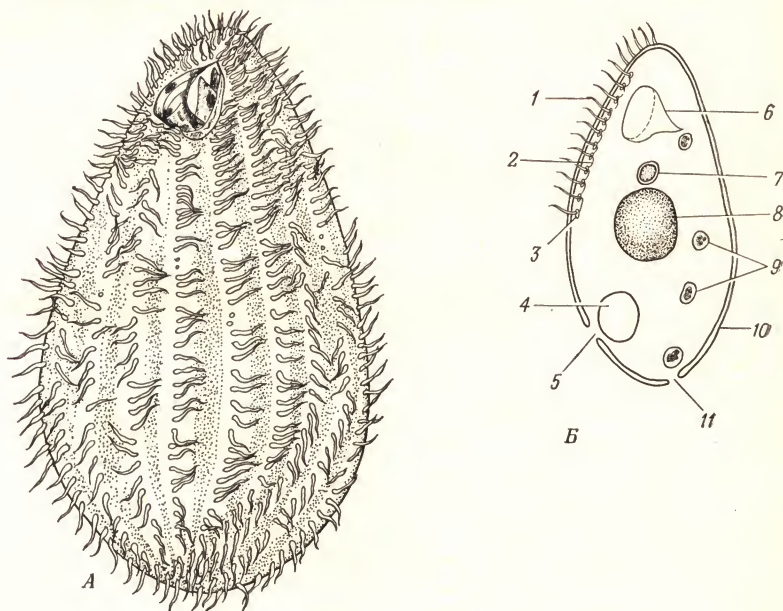
Характерные особенности инфузорий можно проиллюстрировать на примере обычного представителя этой группы — *Tetrahymena pyriformis* (рис. 4.12). У этой инфузории грушевидное тело длиной около 50 мкм, одетое полужесткой пелликулой. Ее поверхность покрыта сотнями ресничек, расположенных продольными рядами. Ритмичное и координированное биение этих ресничек приводит клетку в движение.

Вблизи узкого переднего конца клетки находится «рот», или *цитостом*. Он состоит из ротового отверстия, ротовой полости, ундулирующей мембраны и трех мембранелл. Ундулирующая мембрана и мембранеллы образованы особыми сросшимися ресничками, движение которых гонит частицы пищи в ротовую полость. Захваченная пища поступает в цитоплазму через посредство пищеварительных вакуолей, формирующихся одна за другой у основания ротовой полости. Эти вакуоли циркулируют внутри клетки вместе с токами цитоплазмы до тех пор, пока не переварится пища и не всосутся растворимые продукты; непереваренные остатки выбрасываются из клетки через отверстие, расположенное на заднем конце клетки, так называемую *порошицу* (цитопрокт). В естественных условиях *Tetrahymena* обычно питается более мелкими микроорганизмами. Однако в лабораторных условиях ее можно выращивать в чистой культуре на среде, содержащей только растворимые питательные вещества; при этом капельки жидкости по-прежнему захватываются ртом и переходят в вакуоли.

Рис. 4.12. Инфузория *Tetrahymena*. А. Общий вид. Б. Схематический разрез, показывающий основные структуры клетки. 1 — ресничка; 2 — со-

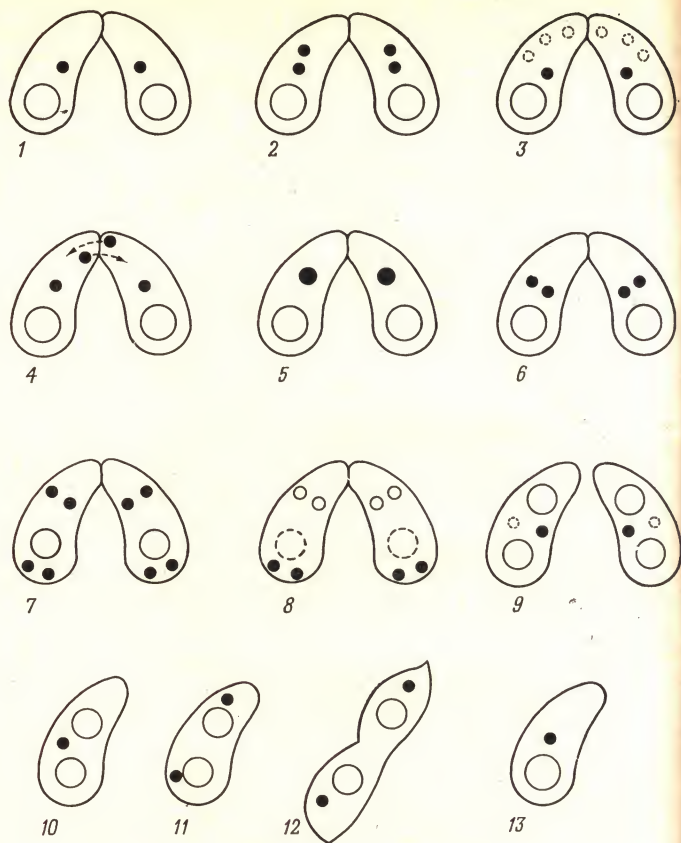
единительная фибрилла; 3 — базальная гранула; 4 — сократительная вакуоль; 5 — пора сократительной вакуоли; 6 — цитофаринкс (глотка); 7 —

микронуклеус; 8 — макронуклеус; 9 — пищеварительные вакуоли; 10 — пелликула; 11 — порошица (цитопрокт).



Хотя осмотическое давление природной среды значительно ниже, чем содержимого клетки, *Tetrahymena* способна регулировать свой водный баланс при помощи *сократительной вакуоли*. Эта структура, расположенная около заднего конца клетки, образуется в результате слияния более мелких вакуолей цитоплазмы; достигнув определенной величины, она изливает свое жидкое содержимое в окружающую среду через отверстие в пелликуле, а затем снова начинает увеличиваться в объеме. Как мы уже упоминали, в клетке типичной инфузории имеются два различных ядра. Большой *макронуклеус* является полиплоидным и необходим для нормального роста и деления клетки; поэтому его иногда называют «вегетативным ядром». Некоторые штаммы *Tetrahymena* обладают только таким ядром; они могут неограниченно долго размножаться путем бинарного деления, но не способны размножаться половым способом. У других штаммов есть еще маленький диплоидный *микронуклеус*, играющий важную роль в половом размножении. Как мы вскоре увидим, после конъюгации макронуклеус может образовываться заново из микронуклеуса, поэтому штаммы, имеющие только макронуклеус, можно рассматривать как дефектные клеточ-

Рис. 4.13. Стадии конъюгации *Tetrahymena*.



ные линии, которые в процессе вегетативного роста, вероятно, случайно утратили микронуклеус. На первом этапе клеточного деления у *Tetrahymena* макронуклеус вытягивается в направлении продольной оси клетки. Тогда же начинается структурная реорганизация цитоплазмы. Главное в этом процессе — формирование *второго цитостома* непосредственно позади плоскости будущего разделения клетки. Затем образуется перетяжка, проходящая через середину клетки, приобретающей таким образом гантелеобразную форму. Если есть микронуклеус, то он делится митотически и два дочерних ядра мигрируют соответственно к передней и задней частям клетки. И наконец, делится удлинённый макронуклеус, после чего дочерние клетки расходятся.

Половой процесс у *Tetrahymena* (рис. 4.13) происходит только между клетками двух различных «половых типов». Конъюгирующие клетки сливаются в области цитостома, и их микронуклеусы претерпевают мейотическое деление, образуя по четыре гаплоидных ядра. В каждой клетке три из этих ядер распадаются, а четвертое подвергается допол-

нительному митотическому делению. Затем происходит обмен ядрами между конъюгирующими клетками, причем каждая из них получает одно из двух гаплоидных ядер, образовавшихся из микронуклеуса другого партнера. После такого обмена в каждой из клеток происходит слияние оставшегося гаплоидного ядра с гаплоидным ядром, полученным от партнера. Образующееся при этом диплоидное зиготическое ядро претерпевает два последовательных митотических деления, так что в каждой клетке получается четыре диплоидных ядра. Затем в результате полиплоидизации два из них дают макронуклеусы, а два других сохраняются в виде микронуклеусов. К этому времени старые макронуклеусы в каждой клетке распадаются. Затем партнеры отделяются друг от друга, и теперь каждый из них содержит два новых макронуклеуса и два новых микронуклеуса, причем все эти ядра происходят от зиготических ядер. В каждой клетке по одному микронуклеусу распадается, а оставшийся делится путем митоза, после чего клетка претерпевает бинарное деление с образованием двух дочерних клеток, содержащих по одному макро- и одному микронуклеусу. Эти клетки продолжают размножаться бинарным делением до следующего цикла конъюгации.

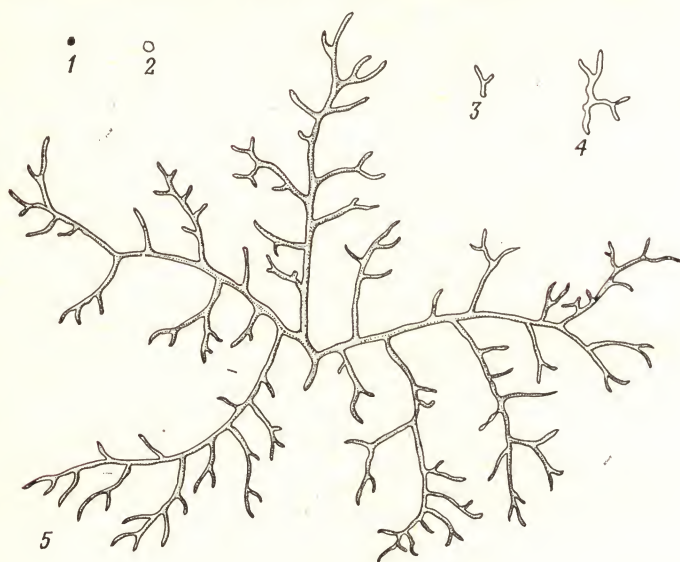
Любопытной особенностью полового процесса у инфузорий является то, что распад трех из четырех дочерних гаплоидных ядер в каждой клетке, сопровождающий мейотическое деление микронуклеуса, *приводит к полной элиминации половины первоначального диплоидного генома клетки.* Таким образом, после деления сохранившегося гаплоидного ядра каждый член конъюгирующей пары содержит два генетически идентичных гаплоидных ядра. Поэтому последующий взаимный обмен ядрами и зиготическое их слияние превращает спаривающиеся клетки в *идентичных диплоидных близнецов*, которые после отделения друг от друга передают в процессе вегетативного роста всему своему потомству идентичные генотипы.

Tetrahymena относится к наиболее простым представителям инфузорий. Приведенного описания достаточно, чтобы показать, какая необычайно тонкая и сложная биологическая организация выработалась в этой группе простейших в рамках одноклеточного строения. Инфузории представляют собой вершину биологической дифференциации на одноклеточном уровне, однако эта группа, по-видимому, является тупиком эволюции. Развитие более сложных биологических систем было уже результатом возникновения многоклеточности и привело к специализации клеток в процессе роста отдельного организма — к типу дифференциации, характерно-

Рис. 4.14. Последовательные стадии развития грибного мицелия из ре-

продуктивной клетки или конидии; $\times 85$. (In-
gold C. T., The Biology of

Fungi, London, Hutchin-
son, 1961.)



ГРИБЫ

Так же как и простейшие, грибы не являются фототрофами. Хотя некоторые из самых примитивных грибов, обитающих в водной среде, обнаруживают черты сходства с жгутиковыми простейшими, в целом грибы выработали совершенно особую биологическую организацию, которую можно рассматривать как приспособление к жизни в наиболее обычной для них среде — почве. Мы начнем с рассмотрения основных особенностей биологической организации этого типа.

Большинство грибов — ценоцитные организмы с вегетативной структурой, называемой *мицелием* (рис. 4.14). Мицелий состоит из многоядерной массы цитоплазмы, наполняющей сильно разветвленную систему жестких трубочек примерно одинаковой толщины. Эти трубочки играют роль защитной структуры подобно клеточной стенке одноклеточных организмов. Обычно мицелий образуется путем прорастания и разрастания одиночной репродуктивной клетки — споры. При прорастании грибная спора дает длинную нить, или *гифу*, которая, удлиняясь, многократно ветвится и образует целую систему нитей, т. е. мицелий. Характерно, что рост грибов происходит только за счет кончиков гиф; по мере разрастания мицелия цитоплазма в старых, центральных участ-

ках может исчезать. Размеры единичного мицелия не ограничены; периферийный рост путем удлинения гиф может продолжаться до тех пор, пока хватает питательных веществ, и у некоторых базидиомицетов отдельный мицелий может занимать участок до 15 м в диаметре. Бесполое размножение, как правило, происходит путем образования одноядерных или многоядерных спор, которые отшнуровываются на концах гиф. Споры и мицелий высших грибов не способны к движению. Хотя содержимое внутри мицелия перетекает, это не может привести к передвижению его по субстрату, поскольку цитоплазма полностью заключена в клеточную стенку. В сущности, структуру высшего гриба можно проще всего охарактеризовать следующим образом: это *многоядерная масса цитоплазмы, подвижная внутри сильно разветвленной замкнутой системы трубочек*.

Поскольку мицелий способен к почти неограниченному росту, он часто приобретает макроскопические размеры. Правда, в природе вегетативный мицелий грибов редко может быть виден целиком, так как он обычно погружен в почву или иной непрозрачный субстрат. Однако многие (шляпочные) грибы образуют специализированные, производящие споры *плодовые тела*, которые возвышаются над землей и легко видимы как макроскопические объекты. Они были известны задолго до возникновения научной биологии, хотя их природа и способ образования не были достаточно понятны до XIX столетия. Некоторое внешнее сходство этих плодовых тел с растениями, несомненно, явилось очень важным фактором, заставившим ранних биологов отнести грибы к царству растений, несмотря на их неспособность к фотосинтезу.

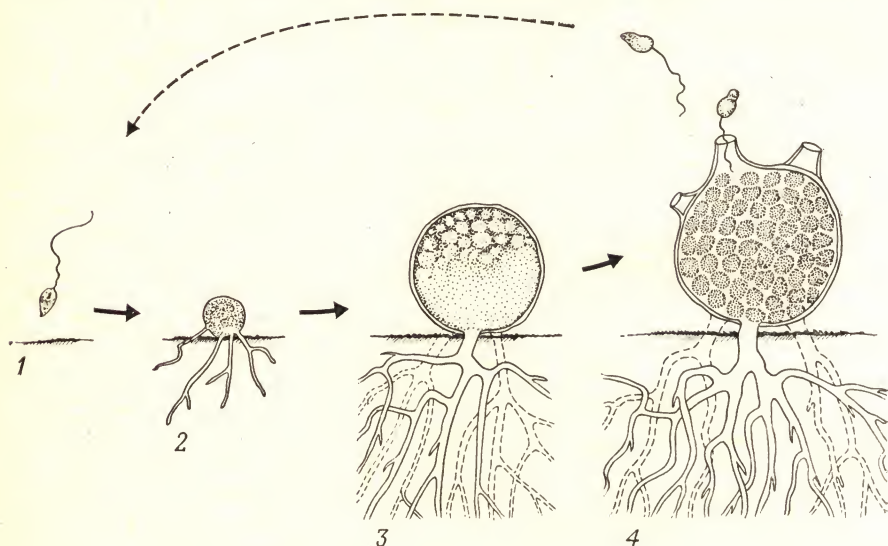
Так как грибы всегда одеты жесткой оболочкой, они не могут поглощать более мелкие микроорганизмы. Большинство грибов живет свободно в почве или в воде и получает энергию в результате дыхания или сбраживания растворенных органических веществ, находящихся в этих средах. Некоторые грибы паразитируют на растениях или животных. Ряд почвенных форм — хищники; у них выработались хитроумные «ловушки», построенные из специальных гиф для ловли и умерщвления простейших и мелких беспозвоночных, например почвенных нематод. Гифы таких грибов проникают в тело животного после его гибели и поглощают содержащиеся в нем питательные вещества.

Грибы подразделяются на три основные группы: *Phycomycetes*, куда относятся низшие грибы, и две группы высших грибов — *Ascomycetes* и *Basidiomycetes*. Четвертая группа — несовершенные грибы — стоит особняком, так как содержит виды, у которых половая стадия пока неизвестна, а поэтому не установлено и систематическое положение.

Рис. 4.15. Жизненный цикл представителя примитивных хитридиевых грибов. 1. Жгутиковая зооспора оседает на поверхность твердого суб-

страта. 2. Начинается развитие и образуется разветвленная система ризоидов, закрепляющая гриб на поверхности. 3. Рост приводит к фор-

мированию сферического зооспорангия, внутри которого образуется множество зооспор. 4. Зооспорангий прорывается, освобождая зооспоры.

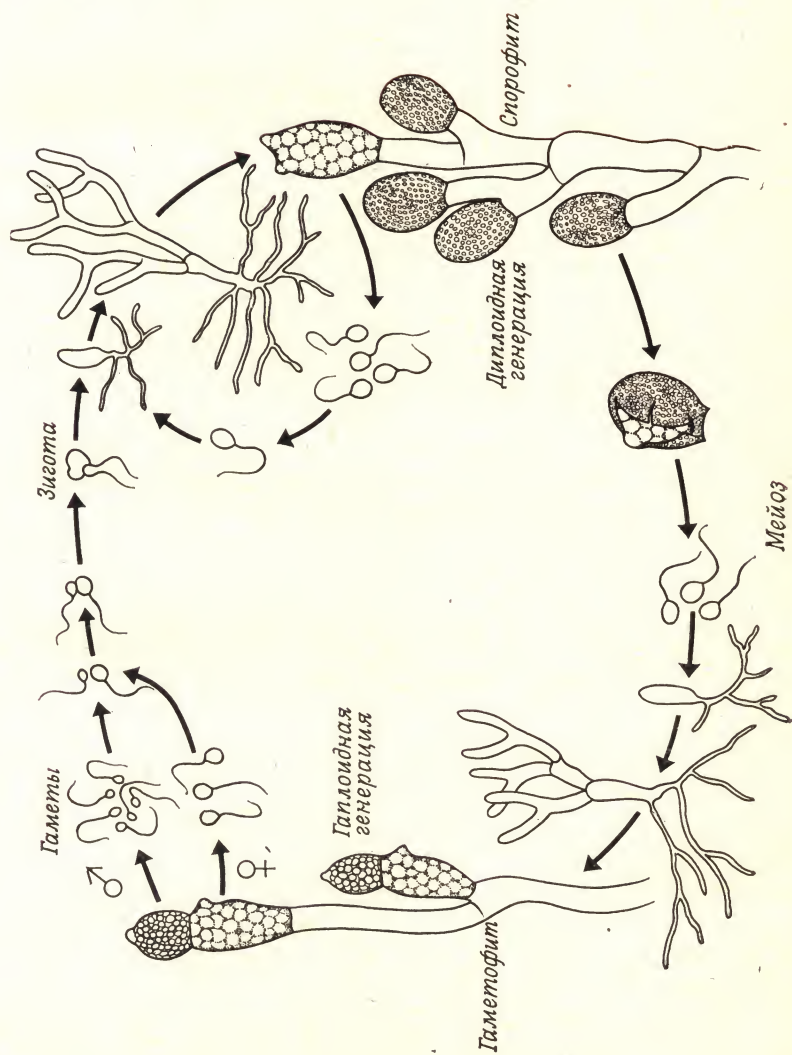


ПРИМИТИВНЫЕ ГРИБЫ: ВОДНЫЕ ФИКОМИЦЕТЫ

Хотя в целом для грибов наиболее обычной средой обитания служит почва, многие примитивные грибы — водные формы. Их объединяют в группу *водных фикомицетов*. Они встречаются на поверхности гниющих растительных или животных остатков в прудах и проточных водоемах; некоторые паразитируют на водорослях или простейших. Именно эти грибы ближе всего напоминают простейших; они образуют подвижные, снабженные жгутиками споры или гаметы, а вегетативное тело у более простых форм не имеет мицелиальной структуры. Таковы, например, многие представители *хитридиевых*.

Цикл развития типичного представителя примитивных хитридиевых, встречающегося на гниющих листьях в прудах, представлен на рис. 4.15. Зрелое вегетативное тело представляет собой мешок величиной около 100 мкм, который прикреплен к твердому субстрату с помощью тонких ветвящихся нитей, называемых ризоидами. Этот мешок — *спорангий*; в нем образуются репродуктивные клетки (споры). Заключенная в мешке цитоплазма содержит много ядер, образующихся путем повторных делений в процессе вегетативного роста. В конце концов каждое ядро с окружающим

Рис. 4.16. Жизненный цикл *Allomyces* — водного фикомицета с четко выраженной сменой гаплоидных и диплоидных поколений. (Рисунки Р. Родригеса, перепечатываются с разрешения А. Брайса.)



участком цитоплазмы одевается мембраной. Затем спорангий прорывается и освобождает одноклеточные жгутиковые зооспоры, каждая из которых может осесть на новом организме-хозяине и прорасти в него. Ризоиды не являются репродуктивными структурами; они служат исключительно для прикрепления развивающегося спорангия к субстрату и для поглощения питательных веществ, необходимых для его роста.

Водные фикомицеты — весьма разнообразная группа в отношении способов размножения и жизненных циклов. Масштабы этих различий можно хорошо проиллюстрировать, сравнив хитридиевых с водным фикомицетом *Allomyces*, у которого имеется четкая смена гаплоидных и диплоидных поколений (рис. 4.16). Рассмотрим сначала диплоидный спорофит. В зрелом состоянии он выглядит как микроскопическое деревце с базальной системой прикрепительных ризоидов. От ризоидов берет начало сильно разветвленный мицелий, несущий спорангии двух различных типов: стенки митоспорангиев тонкие, гладкие, бесцветные, тогда как у мейоспорангиев стенки толстые с темными порами. При созревании из спорангиев обоих типов выходят жгутиковые споры, однако их последующее развитие протекает совершенно по-разному. Диплоидные митоспоры, происходящие из митоспорангиев, прорастают, образуя спорофитный организм. Мейоспоры, происходящие из мейоспорангиев, гаплоидны, так как в процессе созревания мейоспорангия происходит мейоз; они дают начало гаплоидным гаметофитным организмам.

Гаметофит сходен по своему строению со спорофитом, однако вместо мейо- или митоспорангиев он образует мужские и женские гаметангии, которые обычно возникают парами. Женский гаметангий внешне очень похож на митоспорангий, тогда как мужской гаметангий отличается ярко-оранжевым цветом. Гаметангии разрываются, освобождая большое число мужских или женских гамет. Как мужские, так и женские гаметы движутся с помощью жгутиков, но их легко различить по величине и цвету. Женские гаметы крупнее мужских и бесцветны, а у мужских в переднем конце находится оранжевая капелька масла. Гаметы, сливаясь попарно, образуют двухжгутиковые зиготы, которые в конце концов оседают, и из них развиваются спорофиты.

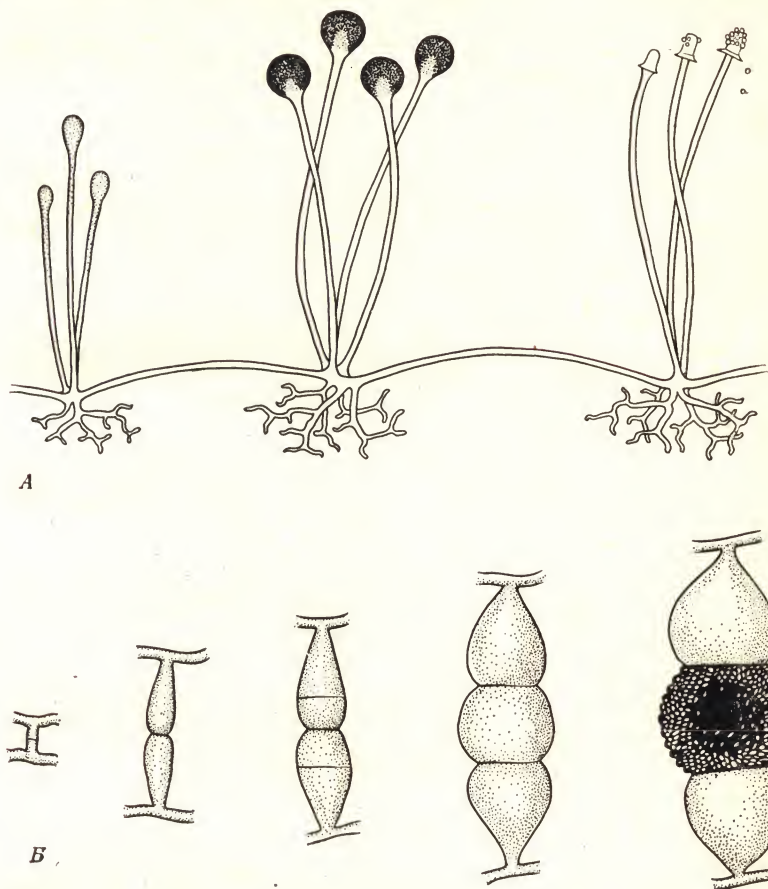
НАЗЕМНЫЕ ФИКОМИЦЕТЫ

В группу фикомицетов входят также наземные фикомицеты, обитающие в почве. Эти организмы отличаются от всех водных фикомицетов отсутствием подвижных репродуктивных клеток, снабженных жгутиками. Таким образом, они всегда неподвижны. Эта особенность объединяет их со всеми группами высших грибов. Отсутствие подвижности, характерное

Рис. 4.17. А. Вегетативные стадии развития наземного фикомицета *Rhizopus*.

Б. Половой процесс у *Rhizopus*. Последовательные стадии слия-

ния мицелиев и образования зигоспоры.



для высших грибов, понятно с точки зрения их экологии: подвижные репродуктивные клетки полезны лишь в том случае, если распространение их происходит в водной среде. Репродуктивные клетки грибов, обитающих в почве, в основном рассеиваются, попадая в воздушную среду.

В качестве типичного примера наземного фикомицета можно рассмотреть *Rhizopus*. Его мицелий образует структуры трех типов: 1) разветвленные ризоиды, проникающие в субстрат; 2) горизонтальные гифы, так называемые *столон*ы, которые распространяются по поверхности субстрата и от которых отходят вниз пучки ризоидов; 3) спорангиеносцы, поднимающиеся прямо вверх над пучками ризоидов (рис. 4.17, А). Неразветвленный спорангиеносец на верхушке расширяется, образуя округлый спорангий, который отделя-

ется перегородкой от остальной части спорангиеносца. Внутри спорангия развивается большое количество сферических спор. В конце концов в результате разрыва окружающей их стенки такие беспольные *спорангиоспоры* освобождаются и разносятся воздушными потоками. Прорастая, они образуют новый вегетативный мицелий.

Rhizopus размножается и половым способом, но это возможно только при контакте двух мицелиев противоположного пола. Грибы с такой дифференциацией мицелиев называют *гетероталлическими* в отличие от *гомоталлических*, у которых (как, например, у *Allomyces*) половые клетки обоих типов образуются на одном и том же мицелии.

У *Rhizopus* два вида мицелия, между которыми возможен половой процесс, обозначают как штаммы + и —, поскольку у них отсутствуют мужские и женские морфологические признаки. При встрече гиф «+» с мицелием «—» каждая гифа дает в точке контакта короткое ответвление. Эта веточка делится, образуя особую клетку — *гаметангий*. Два гаметангия при прямом контакте сливаются, образуя крупную зигоспору, окруженную толстой темноокрашенной стенкой. Вся последовательность событий показана на рис. 4.17, Б. Можно видеть, что поведение обоих партнеров в половом процессе идентично, поэтому нет оснований обозначать их как «мужской» или «женский» типы. При прорастании зигоспоры происходит мейоз и появляется гифа, образующая спорангий. Из гаплоидных спор этого спорангия в свою очередь развивается типичный вегетативный мицелий.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ФИКОМИЦЕТАМИ И ВЫСШИМИ ГРИБАМИ

Все фикомицеты, несмотря на их большое разнообразие, обладают двумя особенностями, которые позволяют легко отличать их от остальных грибов (аскомицетов, базидиомицетов и несовершенных грибов). Во-первых, *вегетативные споры всегда образуются у них эндогенно, т. е. внутри мешковидной структуры* — зооспорангия (у водных форм) или спорангия, содержащего неподвижные спорангиоспоры (у наземных форм). У грибов из других групп вегетативные споры всегда образуются экзогенно — в свободном виде на кончиках гиф (рис. 4.18). Во-вторых, *в мицелии фикомицетов не образуются поперечных перегородок, за исключением концевой участка гифы, где возникает специализированная клетка — спорангий или гаметангий*. Такого рода мицелий называют *несептированным*. У остальных грибов в гифах на регулярных расстояниях друг от друга образуются поперечные перегородки. Таким образом, на основе этих двух простых критериев можно легко отличить фикомицет от грибов любого другого типа.

Рис. 4.18. *Penicillium*. Слева — край колонии при относительно небольшом увеличении; видны споровые головки. Спра-

ва — конидиеносец при большом увеличении; можно видеть его разветвленную структуру и терминальные цепочки

сферических конидий. (Фото предоставлено д-ром К. Рейпером.)



Поскольку мицелий фикомицетов несептирован, эти организмы являются ценоцитными. Напротив, регулярное разделение гиф поперечными перегородками в мицелии остальных грибов наводит на мысль, что мы имеем здесь дело с клеточными организмами. Однако это не так. Перегородки не разделяют цитоплазму на ряд отдельных клеток: в каждой перегородке имеется центральная пора, через которую могут свободно проходить как цитоплазма, так и ядра. Таким образом, у септированных грибов существует такая же непрерывность цитоплазмы, как и у фикомицетов, так что фактически те и другие — ценоцитные организмы.

АСКОМИЦЕТЫ И БАЗИДИОМИЦЕТЫ

Высшие грибы с септированным мицелием и экзогенными вегетативными спорами подразделяются на два класса — аскомицеты и базидиомицеты — на основе особенностей их полового процесса. У этих грибов после образования зиготы сразу же происходит редукционное деление; в результате получают 4 или 8 гаплоидных половых спор, которые образуются внутри или на поверхности структур, называемых *асками* и *базидиями*. Аски характерны для грибов класса аскомицетов, а базидии — для базидиомицетов. У аскомицетов зигота превращается в мешковидное образование — аск, и ядро ее претерпевает два мейотических деления, за которыми часто следуют одно или несколько митотических делений. Вокруг каждого из дочерних ядер и прилегающей к нему цитоплазмы строится клеточная стенка, и таким образом внутри аска обособляются 4, 8 или большее число аско-

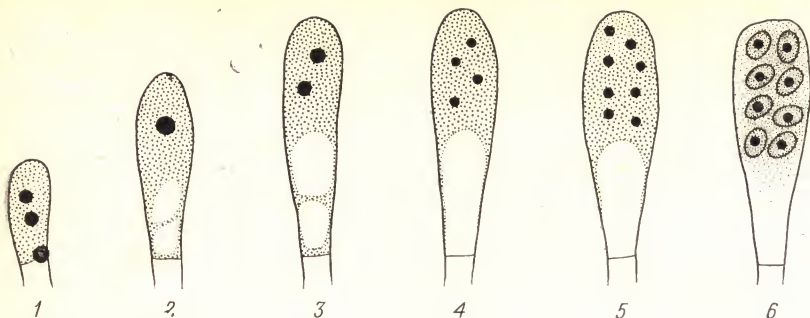
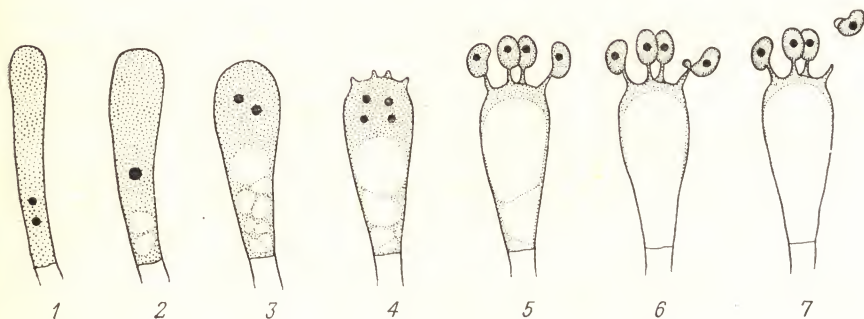


Рис. 4.19. Последовательные стадии образования аска. 1 — двуядерная зигота; 2 — слияние ядер; 3, 4 и 5 — деление ядер; 6 — образование аско-спор.

Рис. 4.20. Последовательные стадии формирования базидии и отделения базидиоспор. 1 — двуядерная зигота; 2 — слияние ядер; 3 и 4 — деление ядер; 5 — образование базидиоспор; 6 и 7 — отделение базидиоспор.



спор (рис. 4.19). В конце концов в результате разрыва аска заключенные в нем споры освобождаются.

У базидиомицетов зигота увеличивается в размерах, образуя булавовидную клетку — базидию; одновременно ее диплоидное ядро делится путем мейоза. Дальнейшая последовательность событий существенно отличается от того, что происходит в асках. Внутри базидии споры не образуются: вместо этого на ее верхнем конце возникают тонкие выросты — *стеригмы* — и, когда они увеличиваются, в них переходят ядра. В конце концов около основания стеригмы образуется перегородка, отделяющая базидиоспору. То же самое происходит и с тремя другими ядрами базидии, так что зрелая базидия несет на своей поверхности четыре базидиоспоры (рис. 4.20). Они освобождаются удивительным способом. После созревания базидиоспоры в точке ее прикрепления к базидии появляется крошечная капля жидкости. Эта

капелька быстро растет, пока не достигнет примерно одной пятой величины споры, после чего совершенно внезапно спора вместе с капелькой отстреливается от базидии.

НЕСОВЕРШЕННЫЕ ГРИБЫ

Подразделение септированных грибов на аскомицеты и базидиомицеты связано с одним практическим неудобством. Очевидно, что правильное отнесение гриба к тому или иному классу возможно только в том случае, если известна половая стадия его жизненного цикла. Если данный гриб не способен к половому размножению или его половая стадия еще не обнаружена, мы не в состоянии сделать выбор — отнести его к аскомицетам или же к базидиомицетам. Поскольку среди высших грибов распространен гетероталлизм, часто бывает, что отдельный изолят аскомицета или базидиомицета никогда не размножается половым способом в отсутствие штамма противоположного пола. Поэтому пришлось создать третью группу — класс несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*) — для тех видов, у которых половая стадия до сих пор не установлена. Необходимо уяснить себе, что «несовершенные грибы» — это по существу временная таксономическая группа; по мере того как у первоначально отнесенных к ней грибов открывают половую стадию, эти организмы переводят в группу аскомицетов или базидиомицетов.

РАЗВИТИЕ АСКОМИЦЕТОВ

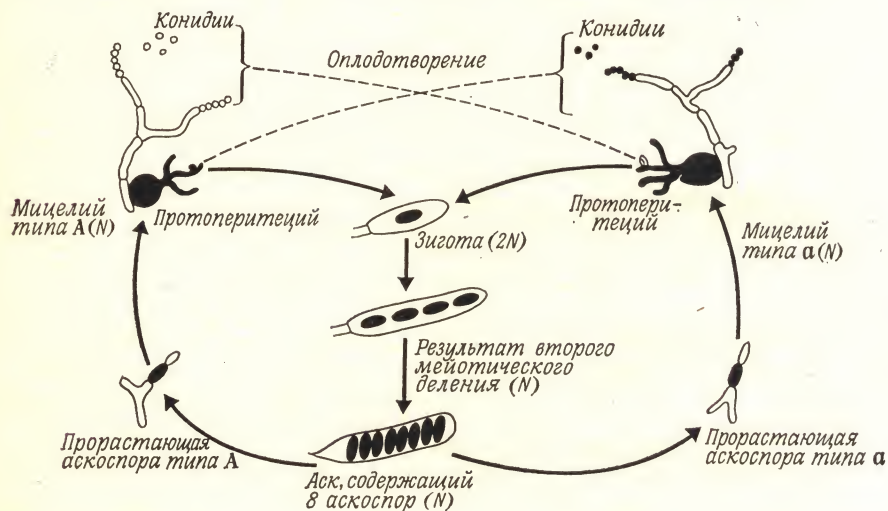
В качестве типичного аскомицета можно рассмотреть плесневый гриб нейроспору (*Neurospora*). Его вегетативная стадия представлена мицелием, на поверхности которого развиваются особые гифы, *конидиеносцы*, содержащие цепочки экзогенных спор — *конидий*. Конидии пигментированы и обуславливают характерный, от розового до оранжевого, цвет колоний нейроспоры. Созревшие конидии легко отделяются и разносятся по воздуху. Приходя в соприкосновение с субстратом, благоприятствующим развитию, они прорастают и вновь образуют вегетативный мицелий.

Нейроспора — гетероталлический аскомицет, у которого существует также цикл полового размножения. Гаплоидный мицелий образует незрелые плодовые тела, называемые *протоперитециями*; они состоят из спиральной гифы, заполняющей полую сферу, которая формируется из плотной массы обычных гиф. Когда гифа мицелия противоположного полового типа вступает в контакт с протоперитецием, она сливается с его внутренней спиральной гифой, а ядра обоих гаплоидных штаммов поступают в общую цитоплазму. Ядро каждого типа делится повторно, так что получается множество гаплоидных ядер противоположных половых типов. В конечном счете они сливаются попарно с образованием большого числа диплоидных ядер, которые тотчас же претер-

Рис. 4.21. Жизненный цикл гетероталлического аскомицета *Neurospora*. Бесполое размножение происходит путем образования конидий гаплоидным мицелием каждого из половых типов — А и а. На этих мицелиях образуются также прото-

перитеции, которые, будучи оплодотворены конидиями или гифами мицелия противоположного полового типа, превращаются в перитеций; внутри перитециев формируются многочисленные зиготы. Каждая зигота претерпевает два

мейотических и одно митотическое деление с образованием аска, содержащего восемь аскоспор, из которых четыре принадлежат к типу А и четыре — к типу а. Прорастание аскоспор вновь дает начало гаплоидному мицелию.



певают мейоз. В месте каждого мейоза вокруг четырех гаплоидных ядер возникает аск. Тем временем стенка протоперитеция утолщается и пигментируется, превращаясь в зрелый перитеций, содержащий несколько десятков асков. Созревание асков завершается образованием аскоспор, каждая из которых одета внутри аска прочной оболочкой; внутри этой оболочки лежит одно из гаплоидных ядер с примыкающей к нему цитоплазмой. Зрелый аск может содержать 4 или 8 аскоспор в зависимости от того, сопровождался ли мейоз последующим митотическим делением четырех гаплоидных ядер.

Зрелый перитеций имеет приблизительно сферическую форму с короткой выступающей шейкой. В конце созревания на вершине шейки образуется пора, через которую выбрасываются аскоспоры. Подобно конидиям, аскоспоры при своем прорастании дают начало гаплоидному мицелию. Весь жизненный цикл нейроспоры представлен на рис. 4.21.

РАЗВИТИЕ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Наиболее известные представители базидиомицетов — это шляпочные грибы. Случайный наблюдатель видит лишь не-
156 большую специализированную часть организма шляпочного

Рис. 4.22. Разрез шляпочного гриба; показаны подземный вегетативный мицелий и плодовое тело. У созревшего плодового тела (слева) из пластинок на нижней сторо-

не шляпки освобождается и рассеивается ветром большое количество базидиоспор. Справа показано второе, незрелое плодовое тело, только что появившееся на поверх-

ности почвы. (Buller A. H. R., *Researches on Fungi*, vol. 1, p. 219, New York, Longmans Green, 1909.)



гриба, а именно плодовое тело, содержащее базидии. Вегетативная часть организма полностью скрыта от взора и состоит из рыхлого мицелия, который часто распространяется в почве на много метров (рис. 4.22). Вегетативный мицелий растет более или менее непрерывно. При благоприятных условиях (главным образом в период сырой теплой погоды) на его поверхности в разных местах образуются плодовые тела, которые пробиваются через почву наружу и видны на поверхности земли.

У обычного шампиньона (рис. 4.22) плодовое тело состоит из шляпки, сидящей на ножке; оно построено из плотно упакованных гиф. Нижняя сторона шляпки образована радиальными пластинками, каждая из которых несет на себе тысячи базидий. Базидии выступают в горизонтальном направлении из вертикальных стенок пластинки, и выбрасываемые базидиоспоры попадают в воздушное пространство между соседними пластинками, откуда падают на землю. При созревании шляпочного гриба освобождается огромное количество базидиоспор. Положив зрелую шляпку на листок бумаги, через несколько часов можно получить в результате отложения миллионов базидиоспор «негатив» пластинчатой структуры шляпки.

У базидиомицетов широко распространен гетероталлизм. Поэтому изолированные гаплоидные базидиоспоры при прорастании дают начало гаплоидному мицелию, который не способен к плодоношению. Однако при контакте между гаплоидными мицелиями совместимых половых типов происходит слияние гиф, с последующим обменом ядрами и образованием все еще гаплоидного *дикариона*; оба вида ядер оказываются ассоциированы весьма регулярным образом — каж-

дая их пара занимает одно отделение септированного мицелия. В процессе роста дикариона ядра обоих типов делятся синхронно.

Дикариотический мицелий может длительное время расти вегетативно, и во время такого роста никогда не наблюдается слияния ядер. Слияние происходит только тогда, когда возникают базидии, и в каждой базидии оно сопровождается немедленным мейозом с образованием четырех гаплоидных ядер, предназначенных для включения в базидиоспоры.

ДРОЖЖИ

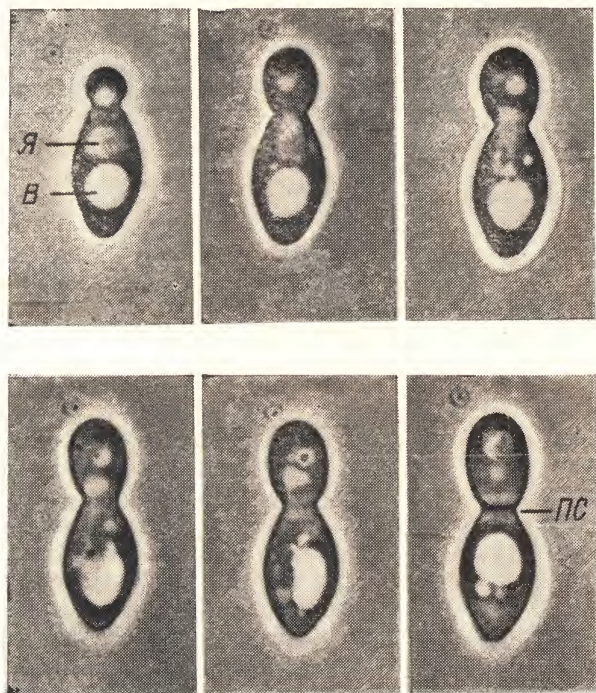
Характерной вегетативной структурой аскомицетов, базидиомицетов и несовершенных грибов является ценоцитный мицелий. Однако в этих классах есть несколько групп, в основном утративших мицелиальный характер роста и ставших одноклеточными. Такие организмы известны под общим названием *дрожжей*. Типичные дрожжи — это небольшие овальные клетки, размножающиеся обычно почкованием. Почки растут, пока не приблизятся по размеру к материнской клетке, затем происходит деление ядер и между двумя клетками образуется поперечная перегородка (рис. 4.23). Хотя по числу видов дрожжи составляют лишь небольшую ветвь высших грибов, они весьма важны с микробиологической точки зрения. Большинство дрожжей не живет в почве, поскольку они адаптировались к средам с высоким содержанием сахаров — таким, как цветочный нектар или поверхность фруктов. Многие дрожжи (бродящие дрожжи) осуществляют спиртовое сбраживание сахаров и издавна используются человеком (см. гл. 31).

Дрожжи имеются во всех трех классах высших грибов — среди аскомицетов, базидиомицетов и несовершенных грибов. Основной возбудитель спиртового брожения, *Saccharomyces cerevisiae*, принадлежит к дрожжам-аскомицетам. На определенной стадии его роста почкование прекращается и вегетативные клетки превращаются в аски, содержащие по четыре аскоспоры. Долгое время полагали, что формированию аскоспор у *S. cerevisiae* не предшествует образование зиготы, так как никогда не удавалось наблюдать в таких случаях спаривание вегетативных клеток. В конце концов, однако, было обнаружено, что зигота образуется в неожиданный момент жизненного цикла — сразу после прорастания гаплоидных аскоспор. Прорастающие аскоспоры или первые возникшие из них вегетативные клетки попарно сливаются, образуя диплоидные вегетативные клетки. Диплоидность сохраняется на протяжении всего последующего периода вегетативного развития, а мейоз происходит перед самым образованием аскоспор. Таким образом, *S. cerevisiae* существует преимущественно в диплоидной фазе. У других аскомицетных

Рис. 4.23. Последовательные стадии почкования у представителя аскомицетных дрожжей *Wickerhamia*. Деление ядра и

образование поперечной перегородки. Фазовый контраст; $\times 1770$. Я—ядро; В—вакуоль; ПС—поперечная перегородка.

(Matile P., Moore H., Robinow C. F., in *The Yeasts*, vol. 1, p. 219, Rose A. N., Harrison J. S., eds., New York, Academic Press, 1969.)



результате слияния вегетативных клеток непосредственно перед образованием аскоспор. Прорастание аскоспор дает начало гаплоидному вегетативному потомству.

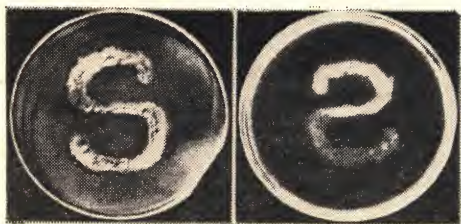
Хотя почкование — преимущественный способ размножения дрожжей, некоторые из них размножаются бинарным делением подобно бактериям; такие дрожжи относят к особому роду *Schizosaccharomyces*.

У дрожжей-аскомицетов вегетативная клетка или зигота в период формирования аскоспор полностью превращается в аск. Дрожжи рода *Sporobolomyces* образуют базидиоспоры, и в этом случае вся вегетативная клетка превращается в базидию. Так же как и у шляпочных грибов, освобождение спор у *Sporobolomyces* — процесс весьма активный, и колонии этих дрожжей легко обнаружить на чашках, инкубируемых в перевернутом положении, так как участок стеклян-

Рис. 4.24. Образование зеркального изображения колонии *Sporobolomyces* в результате освобождения спор в чашке Петри, инкубированной в пере-

вернутом положении. Слева — колония в виде буквы S на поверхности агара; справа — отложенные базидиоспоры на крышке чашки Петри.

(Buller A. H. R., Researches on Fungi, vol. 5, p. 175, New York, Longmans Green, 1933.)



ной крышки, лежащий под колонией этого вида, покрывается налетом выброшенных спор, создающих зеркальное изображение верхней колонии (рис. 4.24).

СЛИЗЕВИКИ

Мы завершим обзор протистов рассмотрением *слизевиков*, или *слизистых грибов*, которые не относят к истинным грибам, хотя по некоторым признакам они сходны с ними. Наиболее известными представителями слизистых грибов являются *миксомицеты* — организмы, часто встречающиеся на гниющих стволах и пнях в сырых лесах. Их вегетативная структура, называемая *плазмодием*, — это многоядерная масса цитоплазмы, которая не имеет жесткой стенки и передвигается по поверхности субстрата подобно амебе, захватывая мелкие микроорганизмы и кусочки гниющей растительной ткани. Активно движущийся плазмодий имеет характерную веерообразную форму с утолщенными гребнями цитоплазмы, отходящими от кромки веера; он напоминает размазанный слой жидкой окрашенной слизи (рис. 4.25). Пока условия благоприятствуют вегетативному развитию, плазмодий продолжает увеличиваться в объеме, что сопровождается повторным делением ядер. В конце концов может накопиться масса цитоплазмы весом в несколько сотен граммов, содержащая тысячи ядер. Плодоношение происходит тогда, когда плазмодий мигрирует в относительно сухой участок субстрата. Из недифференцированного плазмодия развивается плодовое тело, часто удивительной сложности и красоты, как видно на примере *Ceratiomyxa* (рис. 4.26). При этом небольшие одноядерные участки плазмодия одеваются клеточной стенкой и образуется множество одноядерных спор, находящихся на плодовом теле. После отделения споры прорастают, порождая одножгутиковые амебобидные гаметы, при слиянии которых образуются двухжгутиковые зиго-



Рис. 4.26. Плодовые тела миксомицета *Ceratiomyxa* на кусочке дерева [Wilson C. M., Ross I. K., Meiosis in the Myxomycetes, Am. J. Botany, 42, 743 (1955).]



Рис. 4.25. Плазмодий миксомицета *Didymium*, растущий за счет бактерий на поверхности агаровой пластинки. (Фото предоставлено д-ром К. Рейпером.)

ты. Через некоторое время зигота теряет жгутики и развивается в новый плазмодий. Вегетативные ядра растущего плазмодия диплоидны — мейоз происходит перед самым образованием спор в плодовом теле.

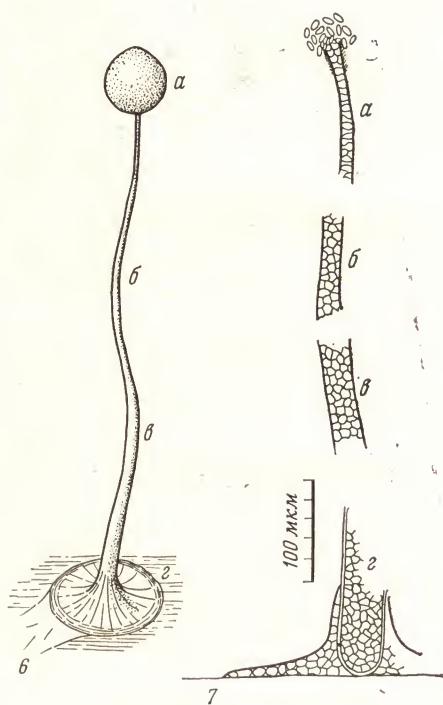
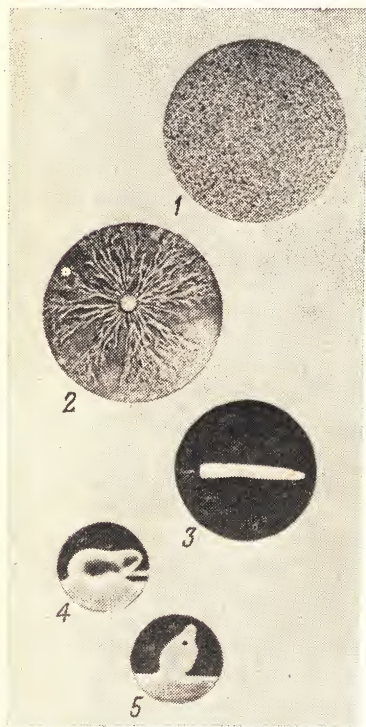
Именно стадия плодоношения миксомицетов сразу же вызывает мысль о сходстве их с истинными грибами. Вегетативная стадия аморфного плазмодия на первый взгляд совсем не похожа на вегетативную стадию грибов — на их разветвленный мицелий; скорее здесь напрашивается сравнение с амебоидными простейшими. На самом деле, однако, плазмодий и мицелий в основе своей сходны. В обоих случаях это ценоцитная (многоядерная) структура, и протоплазма внутри нее может перетекать, хотя в мицелии поток цитоплазмы ограничен стенками разветвленных трубочек. Внешнее различие между плазмодием и мицелием обусловлено, по существу, тем, что в плазмодии цитоплазма не ограничена жесткой оболочкой и может свободно течь в любом направлении.

К слизистым грибам относится также небольшая группа акразиевых (рис. 4.27), которые гораздо более сходны с одноклеточными амебоидными простейшими, чем истинные миксомицеты. Вегетативная фаза у акразиевых представлена небольшими одноклеточными амебами, размножающимися бинарным делением; на этой стадии жизненного цикла их невозможно отличить от небольших амебоидных простейших. Однако при благоприятных условиях тысячи таких отдельных амоб способны агрегировать и объединяться без потери клеточной индивидуальности в плодовое тело сложного строения. Первый признак начинающегося плодоношения — агрегация вегетативных клеток с образованием макроскопически

Рис. 4.27. Жизненный цикл представителя акразиевых *Dictyostelium*. 1—однородная масса вегетативных амёб; 2—агрегирование амёб с образованием плодового цент-

ра; 3—подвижная масса агрегировавших клеток; 4 и 5—ранние стадии образования плодового тела; 6—зрелое плодовое тело; 7—увеличенные срезы разных

участков плодового тела (а—г). [Raper K. B., Isolation, cultivation, and conservation of simple slime molds, Quart. Rev. Biol., 26, 169 (1951).]

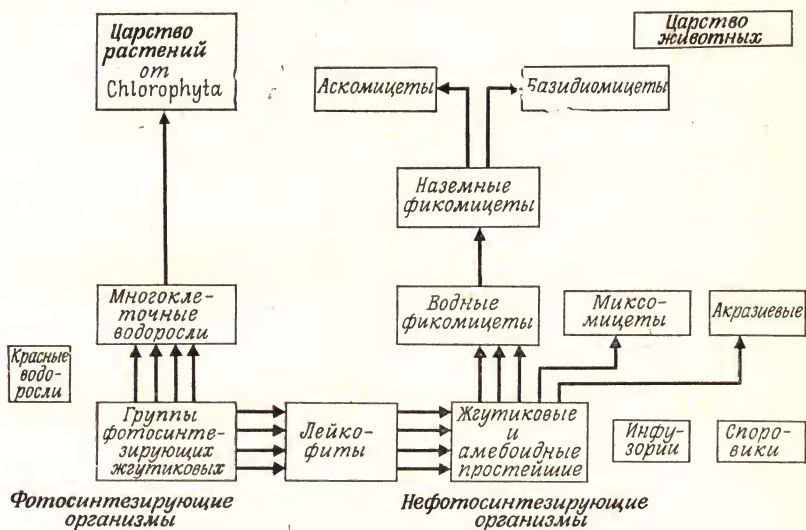


видимой массы. Эта масса клеток постепенно дифференцируется в высокую «ножку», увенчанную круглой головкой из вегетативных спор. На всех стадиях формирования этого плодового тела клетки сохраняют индивидуальность; некоторые из них образуют ножку, которая приобретает жесткость благодаря окружающей ее целлюлозной оболочке, другие вползают по поверхности возвышающейся ножки, формируя споровую головку. Когда последняя созревает, каждая амёба в ней округляется, превращаясь в спору, одетую оболочкой. После отделения споры прорастают и снова образуют обособленные амёбоидные вегетативные клетки. Такой удивительный тип клеточного цикла, в котором построение многоклеточного плодового тела сочетается с одноклеточной фазой вегетативного развития, встречается также в одной из групп прокариот — у миксобактерий (см. гл. 5).

Рис. 4.28. Предполагаемые эволюционные взаимоотношения между различными группами эукариот. Стрелки, связывающие прямоугольники, по-

казывают направления эволюции; наличие нескольких стрелок означает вероятное существование множественных эволюционных связей

между данными группами. Изолированные прямоугольники — группы, для которых эволюционные взаимосвязи не установлены.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В одной главе невозможно дать полное представление о необычайном изобилии и биологическом разнообразии протистов; поэтому в ней были кратко описаны лишь немногие представители каждой из основных подгрупп. Более подробные сведения читатель найдет в специальных монографиях, посвященных водорослям, простейшим и грибам (см. список литературы в конце главы). К сожалению, нет такой книги, в которой была бы с достаточной полнотой рассмотрена вся эта биологическая группа в целом. Всестороннему охвату сравнительной биологии протистов препятствуют значительные терминологические трудности, поскольку ботаники и зоологи используют совершенно различные названия структур, общих для всех трех подгрупп. Во многом различаются и таксономические трактовки, принятые зоологами и ботаниками для жгутиковых водорослей и лейкофитов. Здесь мы попытались преодолеть эти различия и осуществить более широкий, чем обычно, обзор протистов с точки зрения их возможных эволюционных взаимоотношений. Эти предполагаемые взаимоотношения схематически представлены на рис.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

О водорослях

- Fritsch F. E.*, Structure and Reproduction of the Algae, New York, Cambridge University Press, 1935, Vol I; 1945, Vol II.
Lewin R. (ed.), 1962, Physiology and Biochemistry of Algae, New York, Academic Press.
Smith G. M., 1955, Cryptogamic Botany, 2nd ed., Vol. I, New York, McGraw-Hill.

О простейших

- Grell K. G.*, 1973, Protozoology, Heidelberg, Springer-Verlag.
Hall R. P., 1953, Protozoology, Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall.
Mackinnon D. L., Hawes R. S. J., 1961, An Introduction to the Study of Protozoa, New York, Oxford University Press.
Sleigh M., 1973, The Biology of Protozoa, Amsterdam, Elsevier.

О грибах

- Alexopoulos C. J.*, 1962, Introductory Mycology, 2nd ed., New York, Wiley.
Burnett J. H., 1968, Fundamentals of Mycology, New York, St. Martin's Press.

5 ПРОКАРИОТЫ: ВВОДНЫЙ ОБЗОР

Большинство прокариот — одноклеточные организмы. Хотя некоторые из них обнаруживают известную степень дифференциации, в пределах одной клетки здесь не бывает ничего похожего на ту удивительную специализацию, которая характерна для таких протистов, как динофлагелляты или инфузории. У представителей одной группы одноклеточных прокариот — у миксобактерий — в результате агрегации вегетативных клеток образуются многоклеточные плодовые тела, подобно тому как это происходит в цикле развития акразиевых. Многие цианобактерии и некоторые нефотосинтезирующие прокариоты — многоклеточные нитчатые организмы, а не способные к фотосинтезу актиномицеты имеют ценоцитное, мицелиальное строение и размножаются путем образования спор. Однако ни одна из нитчатых или мицелиальных прокариот не достигает размеров и структурной сложности, характерных для таких протистов, как красные и бурые водоросли или грибы-базидиомицеты. Тем не менее интересно то, что у некоторых прокариот мы находим особенности, встречающиеся у протистов, — такие, как формирование многоклеточных плодовых тел, мицелиальный тип роста и простые варианты многоклеточности. Очевидно, эволюция от одноклеточного состояния к более сложным формам развития шла у эукариот и у прокариот параллельными путями.

Хотя разнообразие прокариот в известной степени проявляется и в их морфологии, оно наиболее выражено в отношении метаболических особенностей, и прежде всего механизмов энергетического обмена. У прокариот можно найти все основные типы энергетического метаболизма, характерные для протистов, — фотосинтез, аэробное дыхание и брожение. У некоторых прокариот есть даже такие типы обмена, которых вовсе нет у эукариот, например особые формы фотосинтеза, анаэробное дыхание, разнообразные виды брожения и окисление восстановленных неорганических соединений. Кроме того, многие группы прокариот способны фиксировать N_2 и использовать его как источник азота — свойство, не встречающееся у эукариот.

ВЕЛИЧИНА КЛЕТОК У ПРОКАРИОТ

Как у протистов, так и у прокариот величина клеток значительно варьирует. Самые крупные одноклеточные бактерии намного превосходят по своим размерам мельчайших одноклеточных протистов, поэтому величина клетки не может слу-

жить абсолютным критерием для разграничения этих двух обширных групп микробов. Однако средние размеры клетки у прокариот все же значительно меньше, чем у протистов, и величина мельчайших бактерий лежит далеко за нижним пределом величины клеток эукариот. Клетки некоторых бактерий с трудом различимы в световой микроскоп и перекрываются по размерам с наиболее крупными вирусами.

Поскольку клетки могут сильно различаться по своей форме, единственным показателем, пригодным для сравнения их по величине, может служить объем. В табл. 5.1 представлены данные об объеме клеток некоторых прокариот и протистов, а также частиц (вирионов) ряда типичных вирусов. На основе этих цифр можно установить для каждой из трех групп предельные величины, которые также приведены в таблице.

ТАБЛИЦА 5.1
ВЕЛИЧИНА СТРУКТУРНОЙ ЕДИНИЦЫ НЕКОТОРЫХ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ПРОТИСТОВ И ВИРУСОВ

Природа структурной единицы	Биологическая группа	Объем структурной единицы, мкм ³		Пределы для группы в це- лом
		обычный диапазон	крайние пределы	
Эукариоти- ческая клетка	Одноклеточ- ные водо- росли	5 000—15 000	5—100 000	5—150 000 000
	Простейшие	10 000—50 000	20—150 000 000	
Прокариоти- ческая клетка	Дрожжи	20—50	20—50	
	Фотосинтези- рующие бактерии	5—50	0,1—5 000	0,01—5 000
	Спирохеты	0,1—2	0,05—1 000	
Вирион	Микоплазмы	0,01—0,1	0,01—0,1	
	Вирусы груп- пы оспы	0,01		0,00001—0,01
	Вирус бешен- ства	0,0015	Для каждой группы вели- чина постоян- ная	
	Вирус гриппа	0,0005		
	Вирус полио- миелита	0,00001		

Мельчайший из известных протистов — жгутиковая водоросль *Micromonas*. В клетке этого интересного организма всего лишь один маленький хлоропласт и одна митохондрия. Вместе с ядром они занимают значительную часть всего объема клетки. Поэтому дальнейшее уменьшение размеров подобного организма могло бы быть достигнуто только исключением какой-либо органеллы, жизненно важной для метаболических функций. Таким образом, возможный нижний

предел величины клеток этого типа зависит от *структурных ограничений*.

Нижний предел величины прокариотической клетки в принципе зависит от *молекулярных ограничений*. Любой клетке для ее самовоспроизведения требуется обширный набор *различных ферментов*, т. е. *белков разного типа*. Минимальное число их нам точно не известно, но оно, вероятно, составляет несколько сотен. Кроме того, требуется *много молекул* каждого фермента. К этому следует добавить нуклеиновые кислоты и ряд других органических компонентов клетки, например липиды и углеводы. В общем кажется вероятным, что величина мельчайшей бактерии, которую еще можно увидеть с помощью светового микроскопа, весьма близка к *молекулярному пределу*, связанному с поддержанием клеточных функций.

Минимальная величина вириона — структурной единицы вируса — также определяется молекулярными обстоятельствами. Вирионы состоят только из одного вида нуклеиновой кислоты и одного или немногих видов белка; поэтому их минимальные размеры определяются объемом, занимаемым небольшим числом молекул белка и нуклеиновой кислоты.

Факторы, определяющие минимальную величину, хорошо объясняют, почему клетки некоторых бактерий могут быть более чем на два порядка меньше самой малой эукариотической клетки. Не ясно, однако, почему клетки бактерий не могли бы достигать наибольших размеров, встречающихся у простейших и водорослей, хотя из данных табл. 5.1 видно, что этого не бывает. Вероятно, малые размеры прокариотической клетки определяются несколькими факторами. Прежде всего, существует общебиологическое правило, действительное на всех уровнях биологической сложности: *интенсивность обмена веществ обратно пропорциональна величине организма*. Поскольку скорость роста определяется в первую очередь общей интенсивностью метаболизма, небольшие размеры — необходимое условие быстрого роста. Для многих бактерий при оптимальных условиях характерен необычайно быстрый рост (время удвоения менее часа). Такая скорость роста намного выше, чем у большинства протистов. Несомненно, это дает бактериям решающее биологическое преимущество во многих ситуациях, когда они конкурируют за питательные вещества с протистами; вероятно, это самый важный фактор выживания многих бактерий в природе.

На второй фактор указывают особенности очень крупных бактерий, таких, как хемогетеротроф *Spirillum volutans* и фотоавтотрофы *Chromatium okenii* и *Thiospirillum jenense*. В отличие от представителей тех же физиологических групп с мелкими клетками эти гигантские бактерии чрезвычайно трудно выращивать в культуре — прежде всего в связи с очень узкими пределами физико-химических условий, подхо-

дящих для их развития. Иными словами, они лишены адаптивной гибкости и не могут легко приспосабливаться к небольшим изменениям в окружающей среде. Это означает, что способность *регулировать метаболические функции*, необходимая для адаптивной гибкости, у таких организмов очень невелика. Таким образом, верхний предел величины прокариотической клетки, возможно, определяется трудностью поддержания удовлетворительной регуляции и координации метаболической активности в крупной клетке такого типа.

ПРЕДЕЛЫ ВЕЛИЧИНЫ ГЕНОМА У ПРОКАРИОТ

Недавно разработанные физические методы позволяют относительно легко измерять величину генома, и теперь имеется много таких данных для прокариот. Некоторые из этих величин приведены в табл. 5.2. Обычно они лежат в доста-

ТАБЛИЦА 5.2
ВЕЛИЧИНА ГЕНОМА У ПРОКАРИОТ

Группа бактерий	Величина генома, дальтон · 10 ⁻⁹
<i>Грамположительные бактерии</i>	
Спорообразующие	2,3—2,8
Кокки	1,2—2,8
<i>Грамотрицательные бактерии</i>	
Энтеробактерии	2,1—2,9
Другие нефотосинтезирующие группы	1,0—2,9
Одноклеточные цианобактерии	1,6—4,0
Нитчатые цианобактерии	3,5—5,9
<i>Микоплазмы</i>	0,45—1,1

точно узких пределах, от $1 \cdot 10^9$ до $3 \cdot 10^9$ дальтон. Значительно большие величины встречаются у нитчатых цианобактерий, а намного меньшие — у некоторых микоплазм.

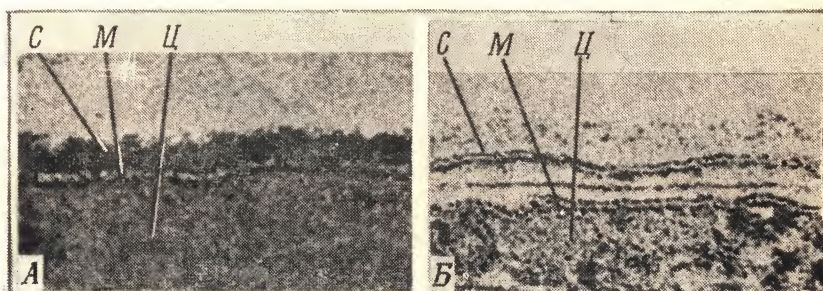
ОСНОВНЫЕ ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЯ ПРОКАРИОТ

Проблема распознавания и разграничения основных групп прокариот чрезвычайно трудна по двум причинам. Во-первых, из-за простоты строения клеток число структурных признаков, пригодных как таксономические маркеры, очень невелико. Во-вторых, редко наблюдается хорошее соответствие между группами, выделяемыми на основе общих *структурных* особенностей и на основе общих *метаболических* свойств. Недавно опубликовано 8-е издание определителя бактерий Бер-

Рис. 5.1. Электронные микрофотографии срезов поверхностных слоев грамположительной бактерии (А) и грамотрицательной бактерии (Б). Можно видеть различия в профиле клеточной стенки. Ц — цитоплазма;

М — клеточная мембрана; С — клеточная стенка. У грамположительной бактерии стенка состоит из одного толстого непрерывного слоя. У грамотрицательной бактерии она многослойная; у данного организма име-

ются тонкий внутренний (пептидогликановый) слой, промежуточный слой, сходный по профилю с клеточной мембраной, и рыхлый наружный слой.



ги (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology), где прокариоты разделены не менее чем на 20 основных групп, критерии для разграничения которых несколько произвольны. Хотя позднее мы рассмотрим эту таксономическую схему (см. гл. 16), она слишком сложна для вводного обзора. Здесь будет принято более простое подразделение прокариот, основанное в первую очередь на структурной характеристике — природе пограничного слоя клетки.

Этот признак позволяет выделить три основные группы: микоплазмы, которые вообще не синтезируют клеточной стенки (внешним пограничным слоем у них служит мембрана); грамположительные бактерии, образующие однослойную клеточную стенку, и грамотрицательные бактерии, у которых клеточная стенка состоит по меньшей мере из двух структурно-различных слоев.

Как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий за механическую прочность стенки ответственны главным образом особые гетерополисахариды — *пептидогликаны*. Однако клеточная стенка всегда содержит и полимеры других типов, химическая природа которых у грамположительных и грамотрицательных бактерий различна. Кроме того, различна у них и локализация пептидогликана в стенке.

Как показывают электронные микрофотографии поперечных срезов клеточных стенок того или другого типа, стенка грамположительной бактерии — это однородная структура толщиной примерно от 20 до 80 нм, тогда как у грамотрицательной бактерии стенка состоит не менее чем из двух легко различимых слоев, каждый из которых значительно тоньше стенки грамположительного организма (рис. 5.1).

Рис. 5.2. Электронная микрофотография клетки *E. coli*. Негативная окраска кремневольфрамом позволяет видеть не-

регулярную структуру поверхности внешнего слоя клеточной стенки; $\times 53\,000$. [Bayer M. E., Anderson T. F., The sur-

face structure of *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 54, 1592 (1965).]

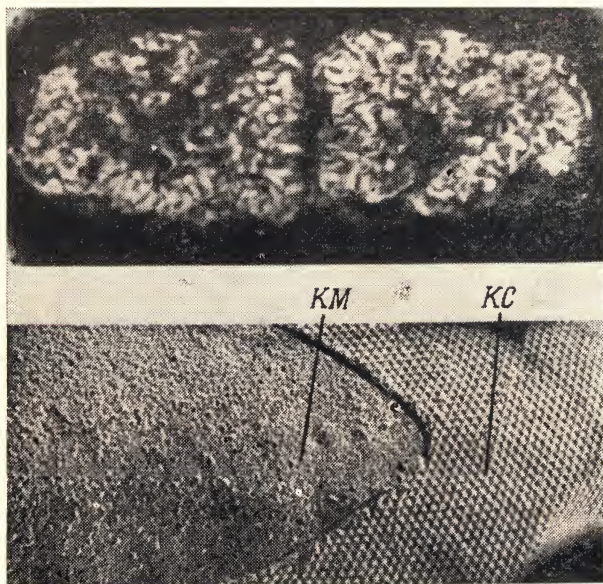


Рис. 5.3. Поверхность клетки морской бактерии *Nitrosomonas*. Электронная микрофотография препарата, полученного методом замора-

живания — травления; $\times 101\,000$. На тангенциальном срезе видна регулярная структура поверхности клеточной стенки (КС) и лежащей

под ней клеточной мембраны (КМ). (Фото предоставлено С. Уотсоном.)

Химический анализ показывает, что стенки грамположительных бактерий содержат в качестве главного полимера пептидогликан (обычно составляющий по весу 50—80% всей массы стенки), с которым связаны полисахариды и полимеры особого типа — тейхоевые кислоты. Тейхоевые кислоты встречаются как компоненты клеточной стенки только у грамположительных бактерий и представляют собой линейные полимеры глицерин- или рибитфосфата. Пока не известно, как именно распределены в однородной структуре стенки пептидогликан, полисахарид и тейхоевая кислота, однако есть данные, что полимеры этих трех типов могут быть частично ковалентно связаны друг с другом, так что каркас стенки образуют чрезвычайно крупные и сложные молекулы. Хотя белки в клеточной стенке грамположительных бактерий имеются не всегда, они иногда бывают связаны с ее внешней поверхностью и образуют здесь регулярную структуру.

Стенки грамотрицательных бактерий содержат плотный однородный внутренний слой толщиной всего лишь 2—3 нм (так называемый *ригидный слой*). Сверху его покрывает несколько более толстый (8—10 нм) наружный слой, тонкая структура которого по существу неотличима от структуры элементарной мембраны, в связи с чем его иногда называют *внешней мембраной*. Однако следует подчеркнуть, что этот слой и по химическому составу, и по функции отличается от плазматической мембраны. Как показывают электронные микрофотографии негативно окрашенных клеток (рис. 5.2), поверхность этого внешнего слоя неровная (что соответствует ее волнообразному профилю на ультратонких срезах). Стенки некоторых грамотрицательных бактерий имеют дополнительный внешний слой, тонкая структура которого часто бывает весьма регулярной (рис. 5.3).

Стенки грамотрицательных бактерий содержат сравнительно мало пептидогликана (у многих видов всего лишь 1—10% общего веса стенки). Химическое фракционирование показывает, что пептидогликан находится только в самом внутреннем ригидном слое, который в сущности представляет собой пептидогликановый мешок, одевающий протопласт. К наружной поверхности этого мешка иногда прикрепляются липопротеидные частицы. Так называемый *внешний мембранный слой* стенки содержит белки, липополисахариды и липопротеиды. Внешние слои с регулярной структурой, встречающиеся у некоторых грамотрицательных бактерий, по-видимому, состоят целиком из белка.

Основные химические различия между клеточными стенками этих двух типов, характерных для прокариот, указаны в табл. 5.3.

ТАБЛИЦА 5.3

ОСНОВНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

Компонент	Грамположительные бактерии	Грамотрицательные бактерии	
		ригидный слой	внешний слой (или слои)
Пептидогликан	+	+	—
Тейхоевая кислота	+	—	—
Полисахарид	+	—	—
Белок	+ или —	—	+
Липополисахарид	—	—	+
Липопротеид	—	+ или —	+

СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРОЕНИЕМ СТЕНКИ И СПОСОБНОСТЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ К ОКРАШИВАНИЮ

Метод дифференциального окрашивания, имеющий большое практическое значение для идентификации бактерий, был эмпирически разработан Кристианом Грамом в 1884 г. и полу-

чил название окраски по Граму. Существует много модификаций этого метода, но все они включают следующие этапы: клетки в мазке, фиксированном путем прогрева, окрашивают сначала основным красителем — кристаллическим фиолетовым, а затем разбавленным раствором иода, после чего препарат короткое время обрабатывают органическим растворителем (спиртом или ацетоном). *Грамположительные* бактерии устойчивы к обесцвечиванию и сохраняют интенсивную сине-черную окраску, а *грамотрицательные* быстро и полностью обесцвечиваются. Для проведения этой процедуры нужно использовать растущие клетки, так как некоторые грамположительные бактерии (например, *Bacillus* spp.) быстро теряют способность удерживать комплекс иода с кристаллическим фиолетовым после прекращения активного роста. Таким образом, реакция Грама в некоторой степени зависит от физиологического состояния клетки.

Механизм реакции Грама до сих пор в точности не известен, несмотря на многочисленные попытки выяснить его. Эту реакцию дают только интактные клетки; разрушенные клетки грамположительных бактерий грамотрицательны. Хотя сам по себе окрашивающий комплекс не локализуется в клеточной стенке, наличие последней необходимо. Это можно показать, окрасив грамположительную бактерию, а затем удалив клеточную стенку путем обработки соответствующими ферментами в изотонической среде. В этих условиях получают интактные протопласты, содержащие комплекс красителей, но потерявшие устойчивость к обесцвечиванию спиртом; таким образом, грамположительность утрачивается после удаления стенки, окружающей клетку. Это означает, что клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой барьер для экстрагирования органическими растворителями комплекса красителей из окружающей ее клетки, но почему это так, остается неизвестным.

Широкое применение окраски бактерий по Граму вскоре показало, что наиболее легко различаемые таксономические подгруппы однородны в отношении этой реакции. Возникло предположение, что существует какое-то фундаментальное химическое различие между грамположительными и грамотрицательными клетками. Вначале пытались найти в грамположительной клетке вещество, которое бы связывало комплекс иода и кристаллического фиолетового, однако такое вещество обнаружить не удалось. Истинная химическая основа реакции Грама стала выясняться лишь около 20 лет назад, когда М. Солтон разработал методы выделения и химического анализа бактериальных клеточных стенок. В дальнейшем было установлено, что результат реакции Грама неизменно коррелирует с рассмотренными выше глубокими различиями в химическом составе и ультраструктуре стенок прокариотических клеток. Поэтому реакция Грама — это

найденный эмпирическим путем и легко осуществимый метод окраски, который разграничивает, хотя и не всегда вполне надежно, две главные подгруппы прокариот, различающихся природой клеточной стенки. К сожалению, дифференциация этих двух подгрупп другими, более надежными методами затруднена; для этого требуется или электронно-микроскопическое исследование структуры стенки на ультратонких срезах клетки, или химическое выявление группоспецифических полимеров. Мы будем называть эти две большие подгруппы *грамположительными бактериями* и *грамотрицательными бактериями*, поскольку более простых общепринятых названий нет; нужно только помнить о том, что окраска по Граму не всегда служит вполне надежным методом дифференциации этих подгрупп. Последнее, в сущности, касается почти исключительно грамположительной группы: некоторые бактерии, несомненно принадлежащие к этой группе (судя по строению и составу клеточной стенки), могут давать или грамотрицательную, или грамвариабельную реакцию.

Нужно подчеркнуть еще один момент в связи с реакцией Грама: *она имеет диагностическую ценность только в применении к прокариотам, обладающим клеточной стенкой*, и не дает полезной таксономической информации относительно микоплазм или эукариотических протистов.

МИКОПЛАЗМЫ

Недавние исследования показали, что микоплазмы (представители рода *Mycoplasma* и близкие к ним организмы) — это большая и широко распространенная группа прокариот, хотя изучение их особенностей шло медленно. Отсутствие клеточной стенки делает клетки пластичными, они легко деформируются и повреждаются, поэтому выяснить их структуру и развитие было нелегко. Кроме того, микоплазмы — хемогетеротрофы со сложными пищевыми потребностями, а это затрудняет их культивирование в искусственных средах.

Первым из представителей данной группы был описан возбудитель плевропневмонии крупного рогатого скота, в результате чего микоплазмы долго называли группой PPLO (от английского «pleuropneumonia-like organisms»). Позднее был описан еще ряд патогенных микоплазм. Многие виды были выделены от человека и других позвоночных, где они встречаются как паразиты на влажной поверхности слизистых оболочек. Микоплазмы — частые загрязнители тканевых культур, выращиваемых на средах, которые весьма благоприятны и для роста этих прокариот. Другие представители группы микоплазм были обнаружены в сосудистых тканях растений, и накапливаются данные в пользу того, что это возбудители многих болезней растений ранее неизвестной этиологии. Свободноживущие микоплазмы найдены в горячих источниках и других средах с высокой температурой.

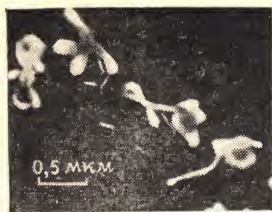


Рис. 5.4. Электронная микрофотография клеток микоплазмы — возбудителя бронхопневмонии крыс; $\times 1230$. [Klieneberger-Nobel E., Cu-

skow F. W., A study of organisms of the pleuropneumonia group by electron microscopy, J. Gen. Microbiol., 12, 99 (1955).]

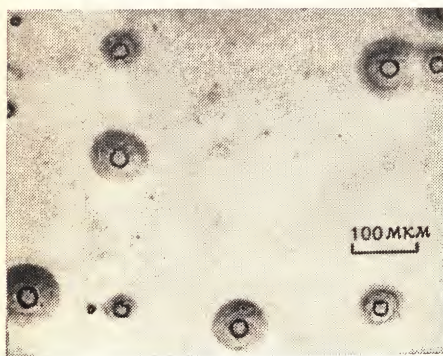


Рис. 5.5. Характерное строение колоний микоплазм; $\times 79$. (Фото предоставлено М. Шифрином.)

Клетки *Mycoplasma* имеют неправильную, изменчивую форму (рис. 5.4). Они могут быть кокковидными или грушеобразными, иногда с нитевидными отростками, могут расти в виде тонких разветвленных или неразветвленных нитей. Один из видов *Mycoplasma*, паразитирующих на растениях, имеет форму спирализованной нити и, как сообщают, подвижен. Другие микоплазмы неподвижны. Обычно клетки невелики и соответствуют по объему сфере диаметром 0,3—0,9 мкм. Таким образом, микоплазмы — мельчайшие из известных организмов клеточного типа: величина их близка к пределу разрешения светового микроскопа. Долго оставался спорным вопрос о способе их размножения, но теперь известно, что они делятся надвое.

Колонии микоплазм на твердой среде имеют характерную структуру «яичницы»: они состоят из непрозрачной, частично погруженной в субстрат центральной зоны и просвечивающей периферии (рис. 5.5).

На основе потребностей в питательных веществах различают два главных рода. Представители рода *Mycoplasma* специфически нуждаются в холестерине. Это вещество в больших количествах включается в клеточную мембрану и, по-видимому, повышает ее прочность. Представители рода *Acholeplasma* не нуждаются в холестерине, однако и они включают его в мембрану, если он имеется в среде.

174 Микоплазмам необходимы также жирные кислоты и белки.

Потребность как в белках, так и в липидах можно удовлетворить сывороткой крови, поэтому в среды для культивирования этих организмов обычно вводят 20% лошадиной сыворотки.

Так как микоплазмы не синтезируют пептидогликанов, они нечувствительны к пенициллинам и другим антибиотикам, избирательно действующим на синтез этих веществ. Это единственные прокариоты, устойчивые к пенициллину, за исключением так называемых *L-форм*, образующихся из некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий. *L-формы* — это мутанты, полностью или частично утратившие способность синтезировать пептидогликаны; они могут быть отобраны путем обработки исходных бактерий пенициллином. Вследствие дефекта клеточной стенки *L-формы* осмотически неустойчивы, и их можно культивировать только на средах с высоким осмотическим давлением. Долго обсуждалось возможное родство бактериальных *L-форм* с микоплазмами, однако теперь общепризнано, что сходство между ними имеет поверхностный характер и не отражает эволюционного родства. *L-формам* несвойственны потребности в питательных веществах, характерные для микоплазм; у *L-форм* частично сохраняется дефектная клеточная стенка, и они, несомненно, генетически почти идентичны тем бактериям, от которых эти формы произошли.

Определение величины генома у прокариот (см. табл. 5.2) показало, что виды *Mycoplasma* занимают в этой группе особое положение: у них очень мало генетической информации — в лучшем случае вдвое меньше, чем у остальных прокариот. Эта особенность придает им исключительный биологический интерес, поскольку количество информации у них, по-видимому, близко к нижнему пределу, необходимому для кодирования всех признаков организма клеточного типа.

ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

Почти все грамположительные бактерии — хемотротрофы, получающие энергию за счет аэробного дыхания или брожения. Небольшая подгруппа высокоспециализированных анаэробных хемотротрофов — метанообразующие бактерии — получает энергию путем сопряжения окисления молекулярного водорода с восстановлением CO_2 в метан.

По структурным особенностям можно разделить грамположительные бактерии на четыре основные группы (табл. 5.4). Одна из них содержит одноклеточные организмы с палочковидными или сферическими клетками, размножающиеся поперечным бинарным делением. Сюда входит особая подгруппа *спорообразующих* бактерий, способных к образованию характерных покоящихся клеток — *эндоспор*. Эндоспора образуется внутри вегетативной клетки в процессе особого

Рис. 5.6. Бактериальные эндоспоры. Окрашенный влажный препарат анаэробной спорообразующей бактерии *Clostridium*

в процессе споруляции. Палочковидные вегетативные клетки, разбухшие на одном конце из-за присутствия свальных

сильно преломляющих свет спор. (Фото предоставлены С. Робиноу.)

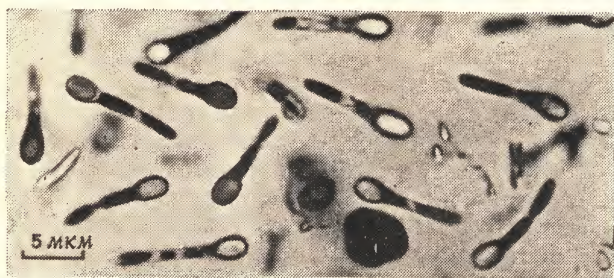


Рис. 5.7. Проращивание спор *Bacillus polymyxa* (А) и *B. circulans* (Б). Окрашенные препараты; $\times 3040$. (Фото предоставлены С. Робиноу и С. Хэнни.)

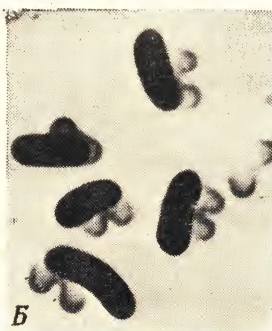


ТАБЛИЦА 5.4

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, РАЗЛИЧАЮЩИЕСЯ СТРУКТУРНЫМИ ОСОБЕННОСТЯМИ

- I. Одноклеточные бактерии с палочковидными или сферическими клетками; размножаются поперечным бинарным делением; некоторые образуют эндоспоры
- II. Коринебактерии — одноклеточные бактерии с тенденцией к структурной нерегулярности. Клетки сферические, палочковидные или разветвленные
- III. Проактиномицеты — бактерии, развивающиеся вегетативно в виде мицелия и размножающиеся путем его фрагментации
- IV. Эуактиномицеты — бактерии, образующие постоянный вегетативный мицелий и размножающиеся с помощью спор, образуемых различными способами на кончиках гиф

деления, который будет подробно описан в гл. 11. В каждой вегетативной клетке, как правило, формируется только одна эндоспора; после созревания она освобождается в результате лизиса окружающей ее материнской клетки. Эндоспоры легко узнать по их высокой преломляющей способности, обусловленной наличием толстой специализированной стенки и



Рис. 5.8. *Streptococcus* — кокки, образующие цепочки; $\times 2710$. (Фото предоставлено Д. Кун и П. Эдлеман.)

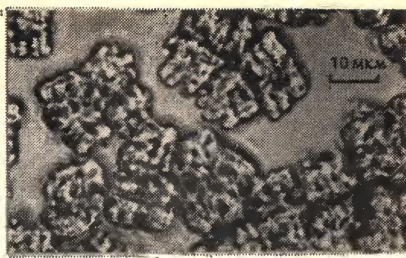


Рис. 5.9. *Sarcina* — кокки, образующие кубические пакеты клеток; $\times 630$. [Canale-Perola E., Wolfe R. S., Studies on *Sarcina ventriculi*, J. Bacteriol., 79, 887 (1960).]

очень малым содержанием воды в находящейся внутри нее покоящейся клетке (рис. 5.6). Они с трудом окрашиваются и чрезвычайно устойчивы к высокой температуре, радиации и токсичным веществам. Образовавшиеся эндоспores могут сохранять жизнеспособность в течение многих лет. При прорастании эндоспores окружающая ее стенка разрывается и из нее выходит вегетативная клетка (рис. 5.7).

Деление палочковидных одноклеточных грамположительных бактерий всегда происходит в экваториальной плоскости, под прямым углом к продольной оси клетки. Многие из сферических одноклеточных грамположительных бактерий тоже делятся регулярно в одной плоскости. Такой способ деления часто приводит к образованию коротких цепочек кокковидных клеток за счет сохранения связи между дочерними клетками после деления (рис. 5.8). Однако сферические клетки некоторых бактерий делятся последовательно в двух или трех плоскостях, лежащих под прямым углом друг к другу, так что получают правильные тетрады или кубические пакеты клеток (рис. 5.9).

Многие грамположительные одноклеточные бактерии неподвижны. Движение, встречающееся у некоторых видов, — это всегда плавание с помощью бактериальных жгутиков. У большинства таких грамположительных бактерий каждая клетка снабжена многочисленными жгутиками, прикрепленными в разных точках поверхности; такой тип расположения жгутиков называют *перитрихальным* в отличие от *полярного*, когда жгутики прикреплены в одной точке у одного из полюсов клетки. У грамположительных бактерий полярное прикрепление жгутиков встречается очень редко. Некоторые грамположительные бактерии постоянно имеют нитевидное строение. Очень крупный подвижный организм *Caryophanon* (рис. 5.10) растет в виде нитей толщиной около 4 мкм и длиной до 40 мкм, снабженных многочисленными жгутиками.

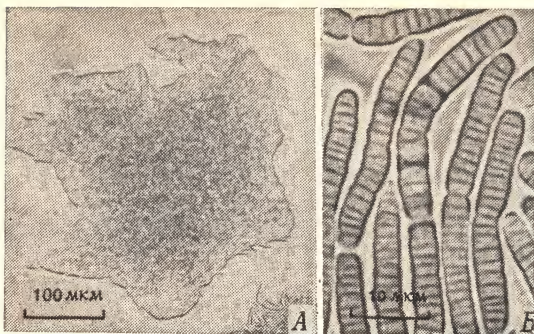


Рис. 5.10. *Caryophanon*. А. Небольшая колония на агаре; $\times 110$. Б. Живые неокрашенные нити; $\times 1100$. [Pringsheim E. G., Robinow C. F., Observations on two very large bacteria. *Caryophanon latum* Peshkoff and *Lineola longa* (nomen provisorium), J. Gen. Microbiol., 1, 278 (1947).]

Рис. 5.11. *Arthrobacter*. А. Коккоидные клетки в стационарной фазе бульонной культуры. Б. Палочковидные клетки в

ранней экспоненциальной фазе роста бульонной культуры. Фазовый контраст; $\times 2100$. [Starr M. P., Kuhn D. A., On the ori-

gin of V-forms in *Arthrobacter atrocyaneus*, Arch. Microbiol., 42, 289 (1962).]



Каждая нить состоит примерно из 30 клеток, которые делятся под прямым углом к продольной оси нити. Размножение происходит путем бинарного деления клеточной нити с образованием двух более коротких нитей.

Для одной из подгрупп грамположительных бактерий — для *коринебактерий* — характерна тенденция к образованию клеток нерегулярной изменчивой формы — сферических, палочковидных и даже разветвленных. Эти организмы, например *Arthrobacter* (рис. 5.11 и 5.12), обнаруживают некоторую способность к мицелиальному росту; таким образом, это пе-

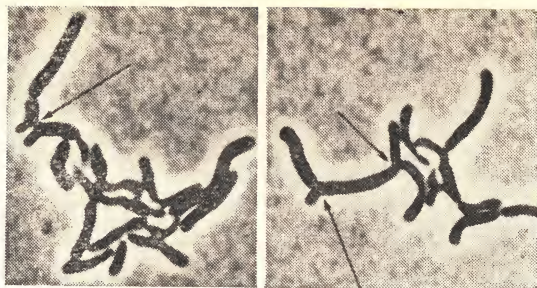


Рис. 5.12. Две микроколони *Arthrobacter* на агаре. Ангулярный рост (указано стрелками). Фазовый контраст; $\times 1035$. [Starr M. P., Kuhn D. A., On the origin of V-forms in *Arthrobacter atrocyaneus*, Arch. Mikrobiol., 42, 289 (1962).]

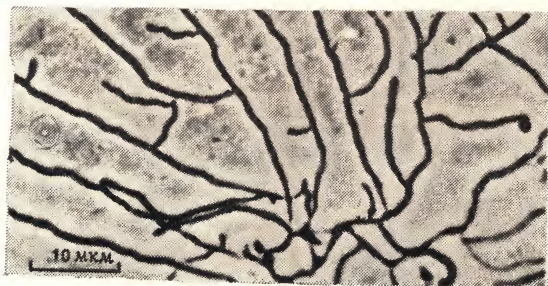


Рис. 5.13. Мицелий актиномицета *Streptomyces*. Фазовый контраст; $\times 1160$. [Hopwood D. A., Phase contrast observations on *Streptomyces coelicolor*, J. Gen. Microbiol., 22, 295 (1960).]

реходная группа между одноклеточными грамположительными бактериями и другой важной группой грамположительных организмов — актиномицетами, для которых характерно образование сильно разветвленного вегетативного мицелия, в основном лишенного поперечных перегородок (рис. 5.13) и внешне сходного с несептированным мицелием некоторых фикомицетов (см. стр. 152).

Размножение актиномицетов может осуществляться двумя различными способами. Мицелий *проактиномицетов* не дифференцирован и в конце концов подвергается более или менее полному распаду на палочковидные или сферические фрагменты. Культуру на этой стадии развития легко принять за культуру одноклеточных грамположительных бактерий.

У *истинных актиномицетов* (Euactinomycetes) мицелий устойчив, и размножаются они путем образования специализированных спор. В простейшем случае, например у *Micromonospora*, на кончиках гиф вегетативного мицелия возникают единичные споры (рис. 5.14). У других эуактиномицетов, например у *Streptomyces*, споры никогда не образуются непосредственно на вегетативном мицелии. Вместо этого на поверхности плотного, кожистого вегетативного мицелия развивается более рыхлый воздушный мицелий, и на кончиках его выступающих гиф в дальнейшем дифференцируются цепочки спор (рис. 5.15). И наконец, некоторые эуактиномицеты (например, *Streptosporangium*) образуют эндогенные спо-

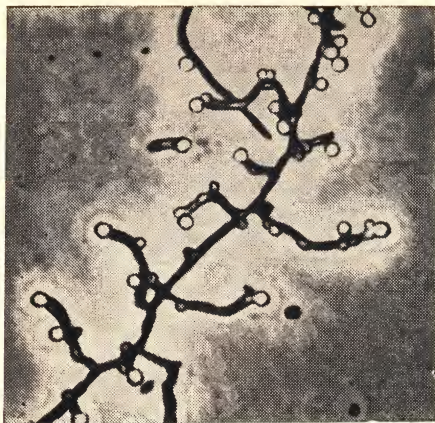


Рис. 5.14. Образование одиночных сферических конидиоспор на вершинах гиф *Micromonospora chalybeata*. Фазовый контраст; $\times 1440$. (С разрешения Г. Людемана и Schering Corporation.)

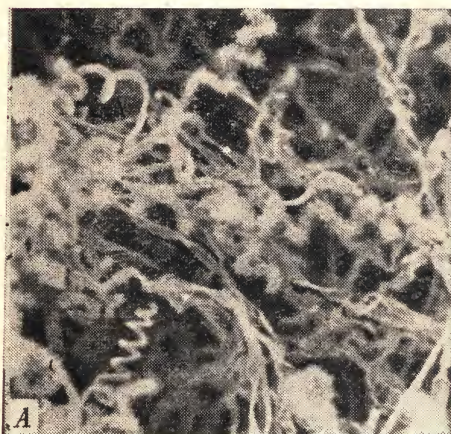


Рис. 5.15. Поверхность колонии *Streptomyces*, наблюдаемая в сканирующий электронный микроскоп. А. Общий вид воздушного мицелия;

$\times 1740$. Б. Закрученная в спираль цепочка конидий. Отдельные конидии (неразличимые на этом снимке) имеют шиповидные выросты; $\times 5800$.

[Kimoto S., Russ J. C. The characteristics and applications of the scanning electron microscope, Am. Scientist, 57, 112 (1969).]

ры внутри концевых вздутий (спорангиев), формирующихся на гифах.

Будучи неподвижными в вегетативной фазе роста, некоторые проактиномицеты и эуактиномицеты образуют подвижные споры с жгутиками. Это характерно для некоторых спорангиальных эуактиномицетов, а также для проактиномицетов рода *Dermatophilus*¹.

¹ Некоторые актиномицеты способны к образованию эндоспор, подобных спорам других бактерий. — Прим. ред.

ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

Трудно в сжатой форме дать общий обзор грамотрицательных бактерий, так как эти организмы и в структурном, и в функциональном отношении весьма разнообразны. Кроме того, подразделение на основе строения не обязательно будет соответствовать подразделению на основе функциональных свойств, таких, как тип энергетического обмена. В этой главе мы коснемся главным образом структурных особенностей, хотя неизбежно будут затронуты и основные черты метаболизма. Можно отметить, что к грамотрицательным бактериям относятся все фотосинтезирующие прокариоты, распределенные по трем совершенно различным таксономическим группам, большинство хемоавтотрофных бактерий и многие группы (иногда высокоспециализированные) хемогетеротрофов.

МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ

Для многих групп грамотрицательных бактерий характерна способность плавать с помощью жгутиков. Прикрепление жгутиков обычно полярное или перитрихальное. Некоторые бактерии — монотрихи, у них только один жгутик на одном из полюсов клетки (рис. 5.16). Другие бактерии с полярны-

ТАБЛИЦА 5.5

АНАЛИЗ СПОСОБА ПРИКРЕПЛЕНИЯ ЖГУТИКОВ У НЕКОТОРЫХ МЕЛКИХ ПАЛОЧКОВИДНЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ¹⁾

Вид бактерий	Число жгутиков на 1 клетку				Видимое место прикрепления каждого жгутика, % от числа всех подсчитанных жгутиков			Вывод о способе прикрепления жгутиков
	сред- нее	процент клеток с указанным числом жгутиков			по- ляр- ное	субпо- ляр- ное	лате- раль- ное	
		1	2	3				
<i>Pseudomonas facilis</i>	1,02	98	2	0	98	1	1	Полярный, монотрихальный
<i>Ps. flava</i>	1,06	94	6	0	69	24	7	Полярный или субполярный, монотрихальный
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	1,55	65	20	15	30	51	19	Рассеянно-перитрихальный
<i>A. eutrophas</i>	2,70	20	29	51	30	45	25	Перитрихальный

¹⁾ Число и место прикрепления жгутиков определяли для 100—150 клеток каждого вида на окрашенных препаратах. [Данные из работы Davis et al., Int. J. Systematic Bacteriol., 19, 375 (1969).]



Рис. 5.16. Окрашенные жгутики *Pseudomonas*, формы, имеющей лишь один полярный жгутик; $\times 1890$. (Фото предоставлено Дж. Хэджеджем и С. Робину.)



Рис. 5.17. Тонкая структура бактериальных жгутиков. Электронная микрофотография полярного участка клетки *Spirillum serpens*, окрашенной фос-

фовольфраматом. Видны многочисленные жгутики, отходящие от поверхности клетки в разных точках; $\times 63\,800$. (Фото предоставлено Р. Марреем.)

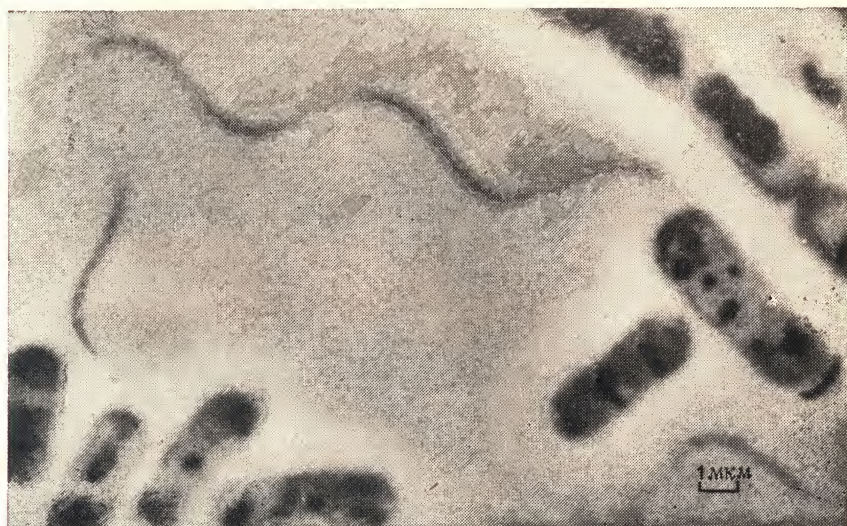
ми жгутиками — мультитрихи — имеют здесь целый пучок из 20—30 жгутиков (рис. 5.17). Отдельный бактериальный жгутик настолько тонок, что неразличим в световом микроскопе, если клетка не окрашена особым способом, который увеличивает кажущуюся толщину жгутика (рис. 5.16). Однако пучки жгутиков у некоторых бактерий-мультитрихов достаточно плотны, чтобы их можно было видеть у живой клетки в фазово-контрастном микроскопе (рис. 5.18), и такие организмы служат ценными экспериментальными объектами для наблюдения за движением жгутиков.

Способ прикрепления жгутиков (полярный или перитрихальный) — отличительный признак, которому по традиции придают существенное значение при классификации грамотрицательных бактерий. Однако иногда его трудно определить на окрашенных препаратах, особенно у бактерий с неболь-

Рис. 5.18. Полярные пучки жгутиков у живых клеток *Sphaerotilus natans* при фазово-контра-

стном освещении; $\times 5670$. [Stokes J. L., Studies on the filamentous sheathed iron bacterium *Sphaerotiti-*

lus natans, J. Bacteriol., 67, 285 (1954).]



шим числом жгутиков, так как не всегда можно правильно установить место их прикрепления. В таких случаях необходимо исследовать большое число клеток и сделать вывод о месте прикрепления жгутиков на основании распределения частот (табл. 5.5).

Кроме этого чисто методического момента можно привести и более основательные возражения против использования способа прикрепления жгутиков в качестве важного таксономического признака. Некоторые грамотрицательные бактерии имеют два разных набора жгутиков — один полярный, а другой перитрихальный. Этот факт может быть установлен с помощью электронной микроскопии, если (как это часто бывает) полярные и перитрихальные жгутики различаются по длине и толщине (рис. 5.19). В таких случаях клетка, по-видимому, содержит два различных набора генетических детерминантов, управляющих образованием жгутиков. Дальнейшие экспериментальные трудности связаны с тем, что один из этих наборов может не во всех условиях проявляться фенотипически; например, у некоторых бактерий жгутики того и другого типа образуются только при низких температурах, так как развитие перитрихальных жгутиков при более высоких температурах подавляется.

У некоторых групп грамотрицательных бактерий встречаются и иные типы клеточного движения. За плавательное

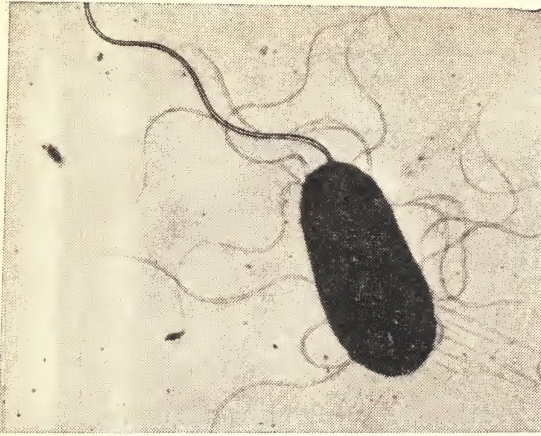


Рис. 5.19. Электронная микрофотография бактерии со «смешанным» полярно - перитрихальным жгутиковым аппаратом. Клетка имеет один относительно толстый полярный жгутик и многочисленные жгутики с латеральным прикреплением; $\times 16\,600$. [Allen R. D., Baumann P., J. Bacteriol., 107, 295 (1971).]

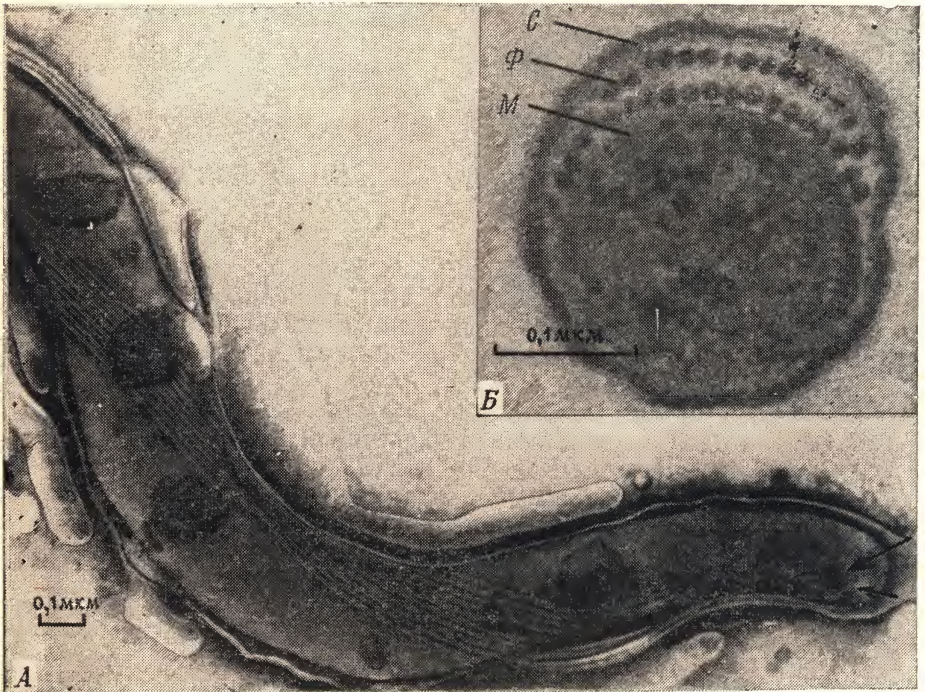


Рис. 5.20. Электронные микрофотографии спирохет из ротовой полости, показывающие строение клетки спирохеты. А. Концевой участок клетки, негативно окрашенной фосфовольфрамом. Можно видеть положение мультифибрилярной

аксиальной нити относительно протопласта и точки прикрепления двух фибрилл около полюса клетки (указаны стрелками); $\times 51\,000$. Б. Поперечный срез крупной спирохеты. Видно расположение фибрилл (Ф) аксиальной нити между

клеточной мембраной (М) и клеточной стенкой (С); $\times 183\,000$. [Listgarten M. A., Socransky S. S., Electron microscopy of axial fibrils, outer envelope and cell division of certain oral spirochetes, J. Bacteriol., 88, 1087 (1964).]

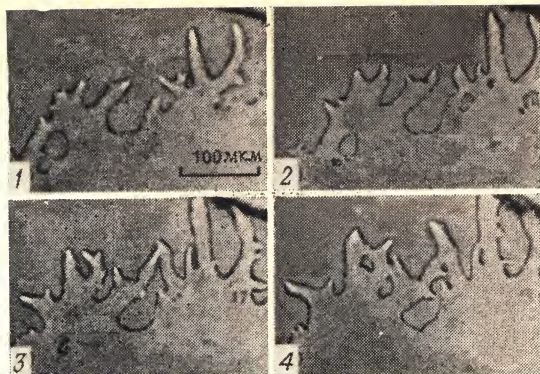


Рис. 5.21. Край колонии миксобактерий, распространяющейся по агару. 1 — первоначальный вид; 2 — через 7 мин; 3 — через 15 мин; 4 — через 25 мин. [Stanier R. Y., Studies of nonfruiting Myxobacteria. 1. *Cytophaga johnsonae*, n. sp., a chitin-decomposing myxobacterium, J. Bacteriol., 53, 310 (1947).]

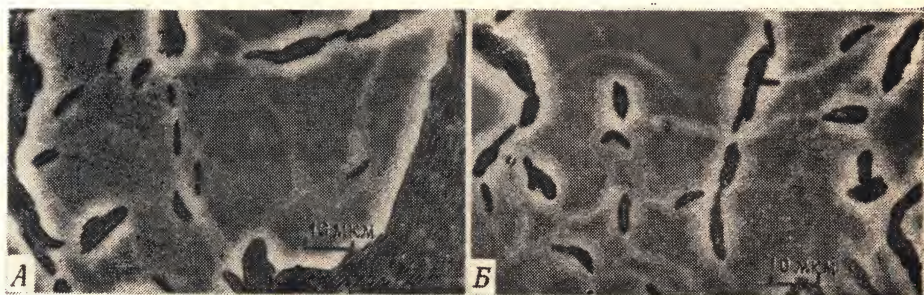


Рис. 5.22. Край зоны роста *Myxococcus fulvus* на агаре. Видны слизи-

стые треки позади движущихся клеток. Фазовый контраст. А — $\times 630$;

Б — $\times 700$. (Фото представлены М. Дворкиным и Х. Рейхенбахом.)

движение спирохет ответственной системы аксиальных фибрилл, плотно обвивающих цилиндрическую клетку и одетых клеточной стенкой (рис. 5.20). К каждому полюсу клетки прикреплено по одному набору фибрилл, и оба набора перекрываются около середины клетки. Аксиальные фибриллы, судя по их тонкой структуре, гомологичны бактериальным жгутикам. Поэтому плавательное движение спирохет можно рассматривать как особую разновидность жгутикового движения.

У многих грамотрицательных бактерий встречается еще один способ перемещения — *скользящее движение*. Его механизм остается неясным, так как у подобного рода бактерий до сих пор не обнаружено никаких двигательных органелл. Такое движение требует контакта с твердым субстратом, и оно значительно медленнее плавания. Скользящие бактерии обычно образуют плоские колонии, распространяющиеся по твердой среде; периферия колонии имеет весьма нерегулярную структуру в результате миграции наружу групп клеток



Рис. 5.23. Электронная микрофотография напыленной металлом клетки *E. coli*. Видны многочисленные пили; $\times 11200$. (Фото предоставлено Бринтоном и Келленбергером.)

Рис. 5.24. Электронные микрофотографии двух пресноводных простекобактерий. А. *Prosthecomicrobium pneumaticum*; $\times 11200$. Внутри клеток видны газовые вакуоли (светлые области).



А



Б

Б. Неидентифицированная делящаяся звездчатая бактерия. [Staley J. T., *Prosthecomicrobium* and *Ancalomicrobium*: new prosthecate freshwater bacteria, J. Bacteriol., 95, 1921 (1968).]

(рис. 5.21). На пути перемещения отдельной клетки часто остается слизистый след (рис. 5.22).

Некоторые одноклеточные грамотрицательные бактерии образуют особые клеточные выросты, не встречающиеся у грамположительных бактерий. Они бывают двух различных типов — *пили* (ворсинки) и *протести*.

Пи́ли — это жесткие цилиндрические палочки, состоящие, подобно жгутикам, из белка; они закреплены в клеточной стенке и выступают далеко за ее пределы (рис. 5.23). Описаны пи́ли разных типов толщиной от 3 до 30 нм. Некоторые из них встречаются в большом числе — до нескольких сотен на клетку; другие, особенно половые пи́ли, обычно немногочисленны (от 1 до 5 на клетку). Способность к образованию пилей — признак изменчивый, он легко утрачивается при мутировании, поэтому бактериальные штаммы данного вида могут быть как с пи́лями, так и без них. Пи́ли не являются органеллами движения, и их единственная известная общая функция — обеспечивать способность к адгезии (прилипанию). Бактерии, обладающие пи́лями, проявляют тенденцию склеиваться друг с другом. Они образуют пленку на поверхности неперемешиваемых жидких культур. Однако пи́ли особого типа — *половые* — имеют важное специальное назначение: **благодаря им клетка способна выступать в качестве до-**

нора генетического материала при конъюгации. У граммотрицательных бактерий для переноса генов при конъюгации всегда требуется наличие у клетки-донора половой пили. Способность к образованию половых пилей сама является трансмиссивным свойством, так как генетически кодируется плазмидами, легко передающимися при конъюгации (см. гл. 15).

Простеки имеют совершенно иное строение. Обычно это нитевидные выросты клеточной стенки и мембраны, которые могут быть в одном или нескольких местах на поверхности клетки (рис. 5.24). Эти образования встречаются во многих группах граммотрицательных бактерий.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Несмотря на отмеченные выше ограничения, механизм движения клеток представляется наилучшим признаком, позволяющим подразделить граммотрицательные бактерии на три главные группы: бактерии со скользящим движением, граммотрицательные зубактерии, передвигающиеся с помощью жгутиков, и спирохеты. Из представителей этих трех групп только спирохеты всегда подвижны. Отнесение неподвижных граммотрицательных организмов к скользящим бактериям или к зубактериям может вызывать сомнение и должно основываться на других чертах сходства с подвижными представителями одной из этих групп.

БАКТЕРИИ СО СКОльзящим Движением

К скользящим бактериям относятся две группы фототрофных организмов: цианобактерии и зеленые бактерии, а также несколько больших групп нефотосинтезирующих бактерий — цитофаги, миксобактерии с плодовыми телами и скользящие нитчатые бактерии.

Фототрофные скользящие бактерии. Несомненно, наиболее крупной и широко распространенной группой фотосинтезирующих прокариот являются цианобактерии. Это фотоавтотрофы и единственные прокариоты, осуществляющие фотосинтез с выделением кислорода. Таким образом, механизмы фотосинтеза у этих бактерий и у фотосинтезирующих эукариот однотипны. Цианобактерии — главные фототрофные обитатели горячих источников, где не встречается почти никаких водорослей-эукариот в связи с их низким температурным пределом. Поскольку многие цианобактерии могут фиксировать N_2 (что совершенно несвойственно эукариотам), они в изобилии населяют бедные азотом почвы и водоемы.

Будучи однородными в отношении питания и метаболизма, цианобактерии различаются по своей морфологии. Не-

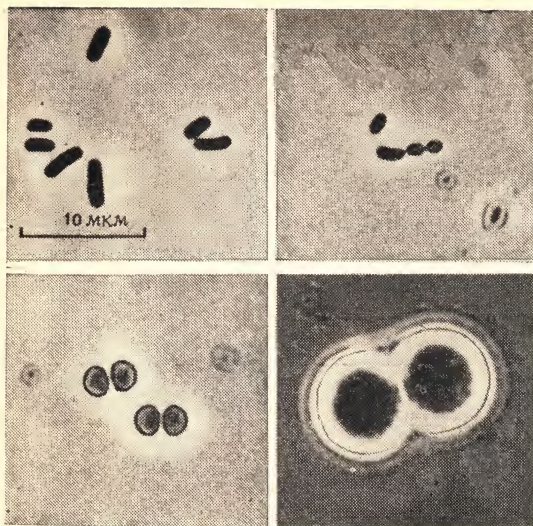


Рис. 5.25. Некоторые одноклеточные цианобактерии. (Фото предоставлены Р. Риппка и Р. Куни-сава.)

которые из них представляют собой неподвижные одноклеточные палочки или кокки, размножающиеся бинарным делением (рис. 5.25). Такие формы иногда образуют колониальные агрегаты, объединенные тонкими многослойными чехлами из отделившегося внешнего слоя клеточной стенки (рис. 5.26).

У некоторых цианобактерий наблюдается особый способ размножения, редко встречающийся у других прокариот, — *множественное деление*. Это единственный способ воспроизведения одноклеточного организма *Dermocarpa* (рис. 5.27). Сначала клетка во много раз увеличивается, а затем быстро претерпевает многократное деление, после которого стенка материнской клетки разрывается и освобождаются дочерние клетки. Дочерние клетки некоторое время подвижны, но с началом роста подвижность теряется. Другие цианобактерии, например *Myxosarcina* (рис. 5.28), могут претерпевать и бинарное, и множественное деление: сначала в результате бинарного деления получают кубические клеточные пакеты, а затем из каждой клетки путем множественного деления образуется большое число мелких дочерних клеток.

Многие цианобактерии — нитчатые организмы, размножающиеся фрагментацией нитей. Одни развиваются в виде простых нитей, другие образуют разветвленные нитчатые структуры (рис. 5.29 и 5.30). У некоторых нитчатых цианобактерий существует известная степень клеточной дифференциации. Отдельные клетки нити могут превращаться в крупные, толстостенные покоящиеся клетки, или *акинеты*, а также в клетки со специализированной метаболической функ-



Рис. 5.26. Крупная одноклеточная цианобактерия, клетки которой объединены в группы многослойным чехлом.

Фазовый контраст; $\times 935$. (Фото предоставлено Р. Риппка и Р. Кунисава.)

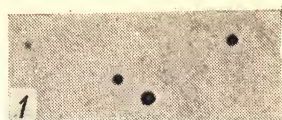
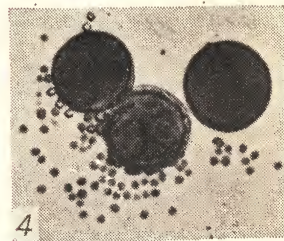


Рис. 5.27. Одноклеточная цианобактерия *Derivocarpa*, размножающаяся только путем множественного деления. Этот ряд микрофотографий, показывающий развитие трех клеток, охватывает период 240 ч. 1—3. Уве-

личение клеток. 4. Освобождение мелких дочерних клеток, образовавшихся путем множественного деления вегетативной клетки; $\times 400$. (Фото предоставлены Дж. Уоттерберри.)



цией — гетероцисты (рис. 5.31). Гетероцисты участвуют в фиксации азота, которая будет рассмотрена в гл. 17.

Небольшую, но своеобразную группу фототрофных прокариот составляют зеленые бактерии, легко отличимые от цианобактерий как по пигментной системе, так и по механизму фотосинтеза, протекающего без выделения кислорода (см. гл. 17). Облигатно анаэробные фототрофные зеленые серобактерии — это маленькие, всегда неподвижные палочки, размножающиеся бинарным делением (рис. 5.32). Один из этих организмов, *Pelodictyon*, растет в виде рыхлой, нерегулярной трехмерной сетки, состоящей из клеточных цепочек (рис. 5.33). Ячейки этой сетки образуются в результате того, что две соседние клетки в цепочке иногда вместо деления пополам делятся на три части, и здесь возникают Y-образные структуры. Если образовавшиеся клетки остаются в контакте между собой, их рост и последующее бинарное деление приводят к построению замкнутой цепи (рис. 5.34).

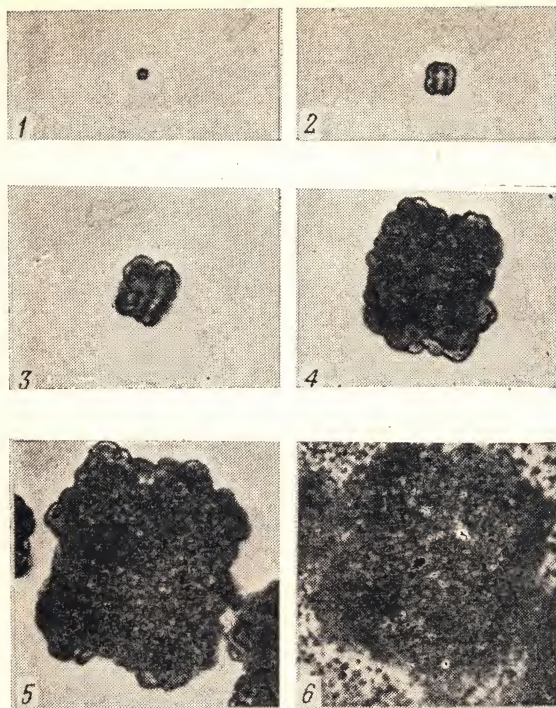


Рис. 5.28. Цианобактерия *Muxosarcina*, размножающаяся как бинарным, так и множественным делением. 1—5. Рост и образование колонии за счет бинарного деления клеток в трех плоскостях под прямым углом друг к другу: 6. Освобождение мелких дочерних клеток, образовавшихся в результате множественного деления клеток колонии. Последовательные микрофотографии, сделанные в течение 550 ч; $\times 432$. (Фото предоставлены Дж. Уотер-бери.)



Рис. 5.29. *Oscillatoria* — цианобактерия, образующая неразветвленные нити; $\times 748$. (Фото предоставлено Р. Риппка.)



Рис. 5.30. *Fischerella* — цианобактерия, образующая разветвленные нити; $\times 467$. (Фото предоставлено Р. Риппка.)



Рис. 5.31. *Cyindrospermum* — неразветвленная нитчатая цианобактерия, образующая дифференцированные клетки двух типов: акинеты (А) и гетероцисты (Г); $\times 339$. (Фото предоставлено Р. Риппка.)

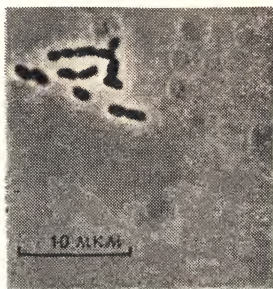


Рис. 5.32. Зеленая бактерия *Chlorobium*. Фазовый контраст; $\times 1420$. (Фото предоставлено Р. Риппка и Р. Кунисава.)



Рис. 5.33. Зеленая бактерия *Pelodictyon*, растущая в виде рыхлой нерегулярной сетки. Фазовый контраст; $\times 1420$. Светлые участки внутри клеток — газовые вакуоли. (Фото предоставлено Н. Пфеннигом.)

Единственная подвижная зеленая бактерия — *Chloroflexus*¹ (рис. 5.35), своеобразный нитчатый организм со скользящим движением, растущий в горячих источниках в ассоциации с термофильными цианобактериями. В отличие от зеленых серобактерий это фотогетеротроф и факультативный аэроб.

Нефототрофные скользящие бактерии. Можно выделить три основные подгруппы нефотосинтезирующих бактерий со скользящим движением (табл. 5.6): миксобактерии, цитофаги и нитчатые формы.

Миксобактерии с плодовыми телами — аэробные хемогетеротрофы; они отличаются прежде всего необычным циклом

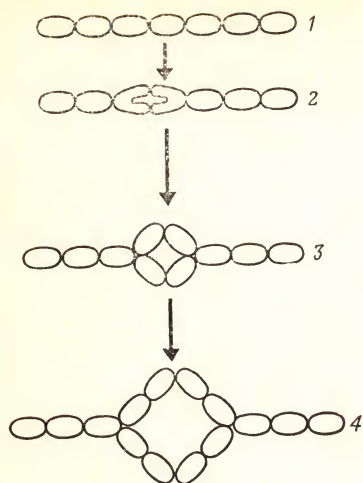


Рис. 5.34. Механизм образования петель у зеленой бактерии *Pelodictyon*. 1. Цепочка клеток, образовавшаяся в результате последовательных бинарных делений. 2, 3. Тройное деление двух соседних клеток цепочки. 4. Увеличение полученной петли путем последующего бинарного деления составляющих ее клеток.

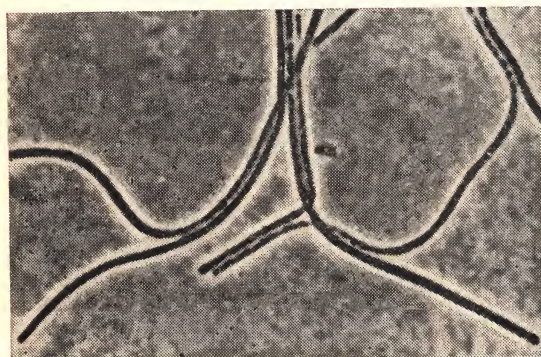


Рис. 5.35. *Chloroflexus aurantiacus* — нитчатая скользящая зеленая бактерия. Фазовый контраст; $\times 1040$. (Фото предоставлено Б. Пирсоном и Р. Кастенхольцем.)

развития. Их вегетативные клетки — это небольшие подвижные палочки, размножающиеся бинарным делением. Они образуют сомкнутые, размазанные колонии, погруженные в слизь или лежащие на ее плотном слое. При подходящих условиях вегетативные клетки на поверхности колонии во многих местах агрегируют и из каждого агрегата образуется ярко окрашенное макроскопических размеров *плодовое тело*, состоящее из клеток и слизи (рис. 5.36). Внутри плодового тела клетки переходят в покоящуюся форму — превращаются в *микроспоры*. У одних родов микроспоры мало отличаются от вегетативных клеток, у других же (например, у *Мухососис*, рис. 5.37) они представляют собой сильно преломляющие свет сферические или овальные тельца, называемые *микроцистами*. Каждая микроспора может прорасти с образованием вегетативной клетки.

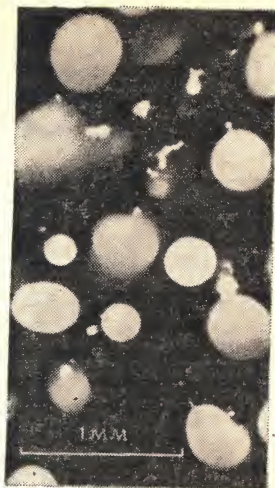


Рис. 5.36. Миксобактерия *Мухососсис*, образующая плодовые тела. Зрелые плодовые тела на частицах навоза; $\times 16$.

(Henrici A. T., Ordal E. J., The Biology of Bacteria, 3rd ed., Boston, Heath, 1948.)

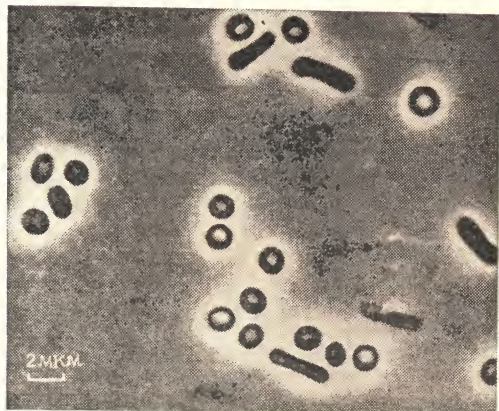


Рис. 5.37. Микроцисты и укороченные палочки из плодового тела *Мухосос-сис fulvus*. Фазовый контраст; $\times 2210$. (Фото предоставлено М. Дворкиным и Х. Рейхенбахом.)

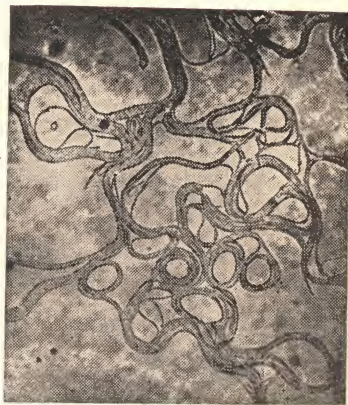


Рис. 5.38. Нити *Vitreoscilla*, растущие на поверхности агаровой пластинки. (Фото предоставлено Э. Прингсхеймом.)

Цитофаги — одноклеточные подвижные палочковидные организмы, размножающиеся бинарным делением и весьма напоминающие вегетативную стадию миксобактерий с плодовыми телами. Однако они никогда не образуют плодовых тел, а покоящиеся клетки известны только у одного представителя этой группы — *Sporocytophaga* — и называются микроцистами. Подобно миксобактериям, образующим плодовые тела, цитофаги — аэробные хемогетеротрофы.

ТАБЛИЦА 5.6

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ НЕФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
СО СКОЛЬЗЯЩИМ ДВИЖЕНИЕМ

Признак	Цитофаги	Миксобактерии с плодовыми телами	Нитчатые скользящие бактерии
Вегетативная структура	Одноклеточные палочки	Одноклеточные палочки	Нити
Способ размножения	Бинарное деление	Бинарное деление	Фрагментация с образованием отдельных клеток или коротких цепочек
Тип покоящихся клеток	Обычно отсутствуют (у одного вида — микроцисты)	Миксоспоры	Отсутствуют
Образование плодовых тел	—	+	—
Образование каротиноидных пигментов	+	+	—

Третью группу скользящих нефототрофных бактерий составляют нитчатые организмы, размножающиеся путем фрагментации нити (рис. 5.38). Они будут подробно рассмотрены в гл. 21.

ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ ЗУБАКТЕРИИ

Сюда относится много групп грамотрицательных прокариот, способных к плавательному движению с помощью жгутиков, а также родственные им неподвижные организмы. Среди них есть одна группа фототрофов — пурпурные бактерии, а также многочисленные группы хемоавтотрофных и хемогетеротрофных прокариот. Все они без исключения одноклеточные организмы; их клетки могут иметь сферическую, овальную, цилиндрическую или спиральную форму. Большинство бактерий со сферическими клетками (грамотрицательные кокки) неподвижны, тогда как организмы со спиральными клетками (спириллы) всегда подвижны благодаря полярным пучкам жгутиков. Среди форм с овальными или цилиндрическими клетками имеются как неподвижные организмы, так и организмы с полярными или перитрихальными жгутиками, а также со жгутиковым аппаратом «смешанного» типа.

Как правило, клетки расходятся вскоре после деления; поэтому агрегаты или цепочки клеток — явление редкое. Исключение составляют бактерии, образующие цепочки или агрегаты клеток, соединенных общей внешней оболочкой, слоями клеточной стенки или слизи, и бактерии, образующие ко-

Рис. 5.39. *Lampropedia* — кокки, образующие плоские прямоугольные пакеты клеток; $\times 1725$. (Фото предоставлено Д. Кун.)

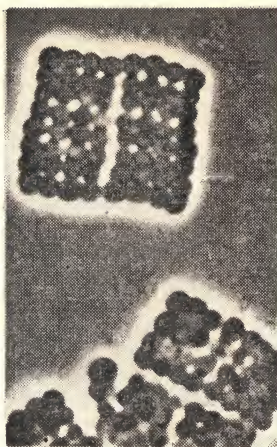


Рис. 5.40. *Bacillus megaterium*. Бактериальные капсулы, видимые благодаря помещению клеток в суспензию туши; $\times 2160$. (Фото предоставлены С. Робину.)



лонии в результате формирования стебельков. Два таких примера будут рассмотрены ниже.

Неподвижные грамотрицательные кокки *Lampropedia* растут в виде плоских, прямоугольных пластинок (рис. 5.39). Клетки делятся последовательно в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, а упорядоченная упаковка сохраняется за счет покрытия внешними слоями очень сложной, многослойной клеточной стенки.

Многие грамотрицательные зубактерии образуют отдельные внеклеточные слизистые слои — *капсулы*, выявляемые методом негативного окрашивания (рис. 5.40). Обычно это не приводит к слипанию клеток после их деления. Однако *Zoogloea* синтезирует сплошной слой студенистой слизи, обволакивающий клетки, и развивается в виде многоклеточных колоний, которые часто достигают макроскопических размеров (рис. 5.41 и 5.42).

Типы деления и клеточные циклы грамотрицательных зубактерий. Как общее правило, зубактерии размножаются путем бинарного поперечного деления с образованием двух идентичных дочерних клеток. Существует, однако, ряд исключений из этого правила.

Вариантом бинарного деления является *почкование*. Оно начинается с образования небольшого выступа на поверхности материнской клетки. Выступ растет, пока не достигнет объема, близкого к объему материнской клетки, а затем отделяется от нее.

Путем почкования размножаются некоторые простекобактерии — пурпурная бактерия *Rhodomicrobium* и аэробный хемогетеротроф *Hyphomicrobium* (рис. 5.43 и 5.44). От небольшой овальной неподвижной материнской клетки отходит очень тонкая, нитевидная простека толщиной около 0,3 мкм, часто в несколько раз длиннее самой клетки. На конце та-



Рис. 5.41. Звездчатые хлопья *Zoogloea ramigera* в бульоне; $\times 23$. [Crabtree K., McCoy E., *Zoogloea ramigera* Itzigsohn, identification and description, Intern. J. Syst. Bacteriol., 17, 1 (1967).]

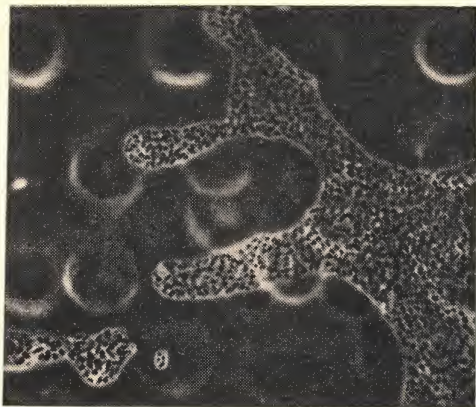


Рис. 5.42. Фазово-контрастная микрофотография выступов на периферии хлопьев *Zoogloea ramigera*. Видны клетки, находящиеся в слизистом слое; $\times 1110$. [Crabtree K., McCoy E., *Zoogloea ramigera* Itzigsohn, identification and description, Intern. J. Syst. Bacteriol., 17, 1 (1967).]

кой простеки формируются почки, вначале сферические. Они увеличиваются, образуют жгутики и после отделения уплывают; когда отпочковавшиеся клетки начинают расти, жгутики отпадают. На простеках часто образуются боковые ответвления, на которых тоже могут возникать почки.

Однако дочерние клетки не всегда отпочковываются на концах простек. У неподвижной бактерии *Ancalomicrobium*, клетки которой имеют от 2 до 8 очень крупных простек (рис. 5.45), почки развиваются прямо на поверхности клетки. По мере роста почка образует собственные простеки, которые бывают полностью сформированы к моменту отделения (рис. 5.46).

Более обычный способ почкования наблюдается у некоторых видов пурпурных бактерий *Rhodopseudomonas*, имеющих полярный жгутик (рис. 5.47). Почки вырастают на том полюсе, где нет жгутика, а новый жгутик образуется на свободном полюсе почки, которая после завершения роста отделяется от материнской клетки.

У каулобактеров, имеющих простеки, клетки делятся на двое, но это всегда приводит к образованию двух *неодинаковых* дочерних клеток. Репродуктивная клетка каулобактера — это неподвижная палочка с нитевидной полярной или

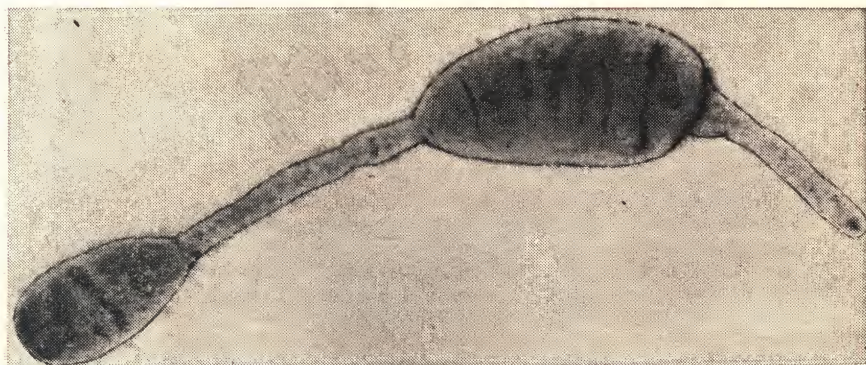


Рис. 5.43. Две почкующиеся клетки *Hyphomicrobium vulgare*. Фазо-

вый контраст; $\times 2450$. (Фото предоставлено П. Хиршем.)

Рис. 5.44. *Hyphomicrobium vulgare*. Электронная микрофотография тотального препарата почкующейся клетки. Видно, что

клеточная стенка переходит в оболочку простека. (Фото предоставлено П. Хиршем.)



субполярной простекой (рис. 5.48). В соответствующем месте на противоположном полюсе сразу после деления образуется жгутик; таким образом, в результате бинарного деления получается одна неподвижная клетка с простекой и одна жгутиковая клетка (швермер), не имеющая простеки. Клетка с простекой может снова делиться таким же способом. Однако клетка, несущая жгутик, не способна делиться, пока она не подвергнется дифференцировке — не потеряет жгутик и не образует на том же месте простеку (рис. 5.49).

Еще один необычный цикл развития, включающий множественное деление, обнаружен у *Bdellovibrio* — паразитических зубактерий, которые атакуют и разрушают другие бактерии (см. гл. 28). Этот паразит — очень маленькая искривленная палочка с единственным полярным жгутиком (рис. 5.50); она проникает внутрь клеточной стенки хозяина и развивается в его периплазматическом пространстве, между

Рис. 5.45. Пресноводная простекобактерия *Ancalomicrobium adetum*. А. Фазово-контрастная микрофотография группы клеток; $\times 2180$. Б. Элек-

тронная микрофотография отдельной клетки. Видно, что простеки ничем не отделены от тела клетки; $\times 8530$. [Staley J. T., *Prosthecomicro-*

bium and *Ancalomicrobium*: new prosthecate freshwater bacteria, J. Bacteriol., 95, 1921 (1968).]

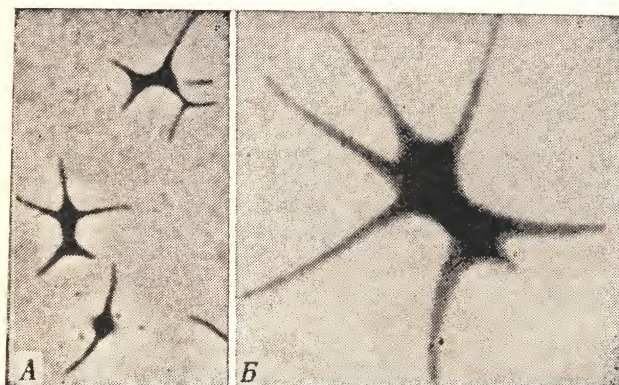


Рис. 5.46. Почкование и рост *Ancalomicrobium adetum*. Ряд фазово-контрастных микрофотографий, охватывающий период 330 мин. В момент 0 мин начинается обра-

зование почки, которая уже имеет одну простеку. Через 120 мин почка достигает размеров материнской клетки и у нее формируется вторая простека. Затем обе клетки

снова начинают почковаться (210 мин); дочерние почки созревают через 330 мин. (Фото предоставлены Дж. Стэйли.)

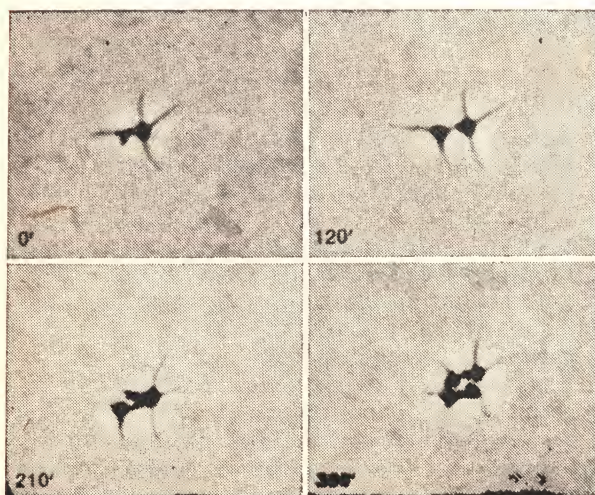


Рис. 5.47. Микрофотографии двух почкующихся клеток *Rhodopseudomonas acidophila* в культуре на предметном стекле. Снимки сделаны с интер-

валами 30 мин, чтобы показать рост почек на полюсах палочковидных клеток; $\times 1500$. [Pfenig N., *Rhodopseudomonas acidophila*, а new

species of the budding nonsulfur purple bacteria, J. Bacteriol., 99, 597 (1969).]



Рис. 5.48. Электронные микрофотографии стебельковых клеток *Caulobacter*; некоторые из них в стадии деления. Препарат напылен металлом; $\times 8850$. Можно

видеть жгутик на дистальном конце дочерней клетки в процессе деления. Обратите внимание на непрерывность тела клетки и стебелька. [Houwink A. E., *Caulo-*

bacter, its morphogenesis, taxonomy, and parasitism, Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol., 21, 1, 54 (1955).]



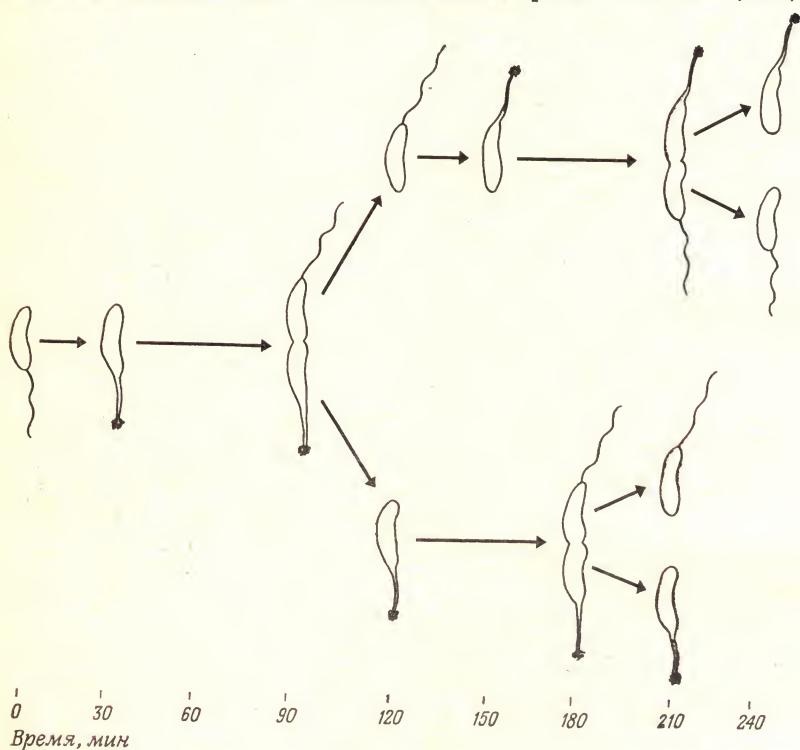
удлиняется, приобретая спиральную форму, и растет за счет питательных веществ, получаемых из протопласта хозяина, который постепенно распадается. Закончив рост, спиральная клетка претерпевает множественное деление, и образовавшиеся вибрионоподобные клетки с жгутиками выходят из оболочки хозяина в поисках новой жертвы (рис. 5.51).

Образование прикрепительного аппарата (фиксаторов). Некоторые водные грамотрицательные бактерии часть жиз-
 199 ненного цикла проводят в неподвижном состоянии. Они при-

Рис. 5.49. Схема клонального роста *Caulobacter*, основанная на непрерывном микроскопическом наблюдении. Вид-

но, что для деления швермера требуется значительно больше времени, чем для деления стебельковой клетки. [Poin-

dexter J. L. S., Biological properties and classification of the *Caulobacter* group, Bacteriol. Rev., 28, 231 (1962).]



крепляются к твердой поверхности с помощью фиксаторов — небольших дисков из липкого материала, выделяемого одним из участков клеточной поверхности.

Образование фиксаторов характерно для каулобактеров; фиксатор образуется в процессе деления на дистальном полюсе швермера. У рода *Caulobacter*, где жгутик и простека также располагаются на полюсах, фиксатор присоединяется к концу простеки после образования этой органеллы. У рода *Asticcacaulis* жгутик и простека субполярные, поэтому полярно расположенный фиксатор остается на поверхности клетки, а не прикрепляется к кончику простеки (рис. 5.52). В чистых культурах бактерий, имеющих фиксаторы, столкновения между подвижными клетками приводят к образованию розеток в результате взаимного склеивания (рис. 5.53).

Стадии покоя. У грамотрицательных эубактерий редко образуются покоящиеся клетки. Это наблюдается у некоторых аэробных азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*, которые образуют микроцисты. Такие структуры возникают

Рис. 5.50. Электронная микрофотография клетки *Bdellovibrio*. Виден необычно толстый по-

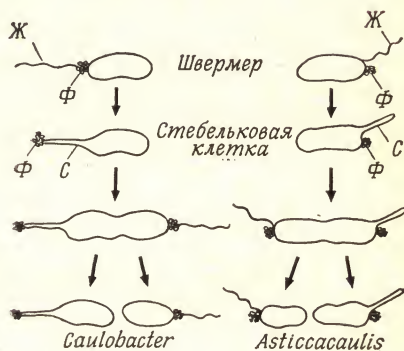
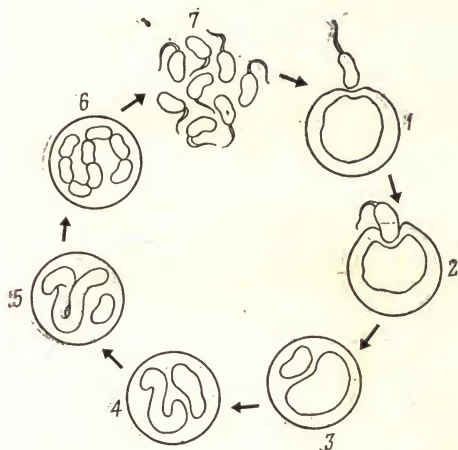
лярный жгутик. Окраска ацетатом уранила; $\times 29\,000$. [Seidler R. J., Starr M. P., Structure of

the flagellum of *Bdellovibrio bacteriovorus*, J. Bacteriol., 95, 1952 (1968).]



Рис. 5.51. Цикл роста *Bdellovibrio* в клетке бактерии-хозяина. 1, 2. Присоединение и проникновение в периплазматическое пространство хозяина. 3—5. Рост и удлинение паразита, сопровождающиеся постепенным разрушением протопласта хозяина. 6. Деление паразита. 7. Освобождение его клеток.

Рис. 5.52. Схема деления и дифференцировки клеток у двух родов стебельковых бактерий — *Caulobacter* и *Asticacaulis*. Ф — фиксатор; С — стебелек; Ж — жгутик. [Schmidt J. M., Stanier R. Y., The development of cellular stalks in bacteria, J. Cell Biol., 28, 423 (1966).]



путем формирования многослойной стенки, окружающей вегетативную клетку (рис. 5.54).

Некоторые группы грамтрицательных зубактерий. Важнейшие группы зубактерий будут детально описаны в последующих главах. Однако две группы — риккетсии и хламидии — заслуживают более подробного рассмотрения в этом разделе, так как в связи с их весьма необычными биологиче-



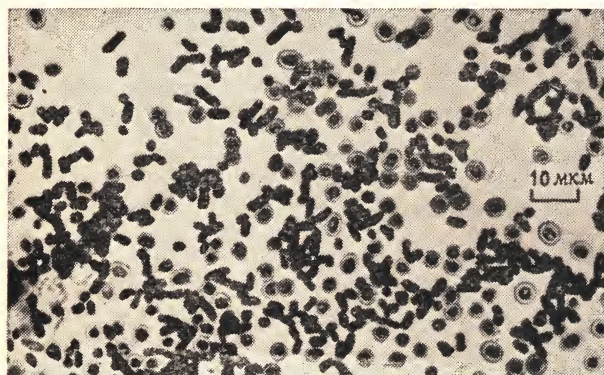
Рис. 5.53. Розетки *Caulobacter*, образующиеся при соединении клеток фиксаторами, находящимися на концах стебель-

ков. Фазовый контраст; $\times 1050$. (Фото предоставлено Дж. Пойндкестер.)

Рис. 5.54. Окрашенный препарат вегетативных клеток и цист *Azotobacter*; $\times 1210$. Вегетативные клетки — овальные

сильно прокрашивающиеся палочки; цисты сферической формы, окружены толстой слабоокрашенной стенкой.

(Winogradsky S., *Microbiologie du sol*, p. 780, Paris, Masson, 1949.)



скими особенностями в свое время возникла фундаментальная таксономическая проблема разграничения клеточных организмов и вирусов.

Подобно вирусам, большинство риккетсий и хламидий являются, по-видимому, облигатными внутриклеточными паразитами: за очень немногими исключениями, все попытки культивировать их на искусственных средах или хотя бы поддерживать в живом состоянии вне клетки хозяина оказывались до сих пор неудачными. Кроме того, поскольку это очень мелкие организмы, одно время полагали, что они могли бы быть переходной биологической группой между бактериями и вирусами, а в некоторых случаях даже представлять собой крупные вирусы. Однако электронно-микроскопическое изучение их тонкой структуры показало, что это клеточные организмы, обладающие типичным строением прокариот. Несколько таких организмов удалось недавно вырастить вне клеток хозяина на сложных искусственных средах. Поэтому есть достаточные основания считать их представителями бактерий.

Риккетсии. Это облигатные внутриклеточные паразиты некоторых членистоногих (особенно блох, вшей и клещей). По-видимому, они не вызывают симптомов заболевания у своего членистоногого хозяина, но в случае передачи их путем укуса хозяину-позвоночному у последнего может возникнуть тяжелое и даже смертельное заболевание. Главная болезнь человека, вызываемая риккетсиями, — сыпной тиф, история которого подробно описана в популярной форме в одном из классических произведений, написанных микробиологом Цинсером (Hans Zinsser, Rats, Lice and History). Кроме того, риккетсии являются возбудителями пятнистой лихорадки Скалистых гор, передаваемой клещами, и японской речной лихорадки (цуцугамуши), которую клещи передают обычно полевым мышам, но иногда и человеку. Лабораторное изучение риккетсий стало делом гораздо более легким, когда выяснилось, что их можно выращивать в желточном мешке куриных эмбрионов — на значительно более удобном объекте, чем животное-хозяин.

Риккетсии — короткие палочки величиной около $0,3 \times 1,0$ мкм (рис. 5.55), размножающиеся бинарным поперечным делением. На их клеточную природу ясно указывает то, что они содержат и ДНК, и РНК, одеты клеточной стенкой и осуществляют некоторые метаболические функции. Строевание их клеток, судя по данным электронной микроскопии ультратонких срезов, носит явно прокариотический характер, что подтверждает и химический анализ: у них обнаружены компоненты пептидогликана.

Еще далеко не ясно, чем обусловлен облигатный внутриклеточный паразитизм риккетсий. Взвеси изолированных клеток способны окислять глутамат путем реакций цикла трикарбоновых кислот, что говорит о возможном наличии у риккетсий автономной системы энергетического обмена. Однако выделенные клетки быстро теряют жизнеспособность. Утрату жизнеспособности задерживает добавление в окружающую среду некоторых коферментов. А так как интактные клетки для этих веществ обычно совершенно непроницаемы, было высказано предположение, что адаптация риккетсий к внутриклеточному образу жизни существенно изменила свойства их клеточной мембраны и клетки приобрели способность поглощать и использовать коферменты или другие сложные вещества, синтезируемые хозяином; однако эти же изменения мембраны сделали риккетсий чрезвычайно уязвимыми во внеклеточной среде.

Хламидии. Хламидии — возбудители ряда болезней птиц и млекопитающих, включая человека. В отличие от риккетсий они не передаются через беспозвоночных, а прямо переходят от одного позвоночного-хозяина к другому. Их клетки диаметром $0,2—0,7$ мкм несколько меньше клеток риккетсий и имеют более или менее сферическую форму (рис. 5.56).

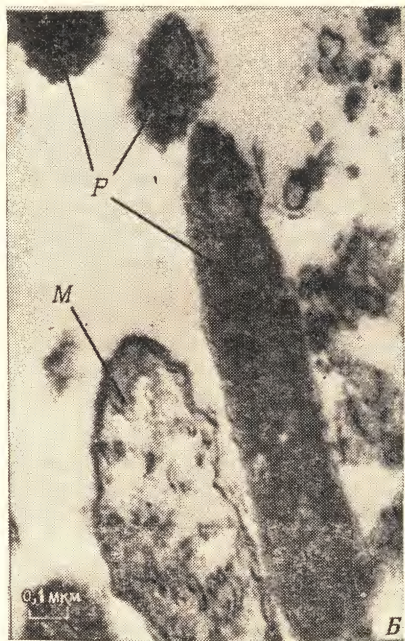
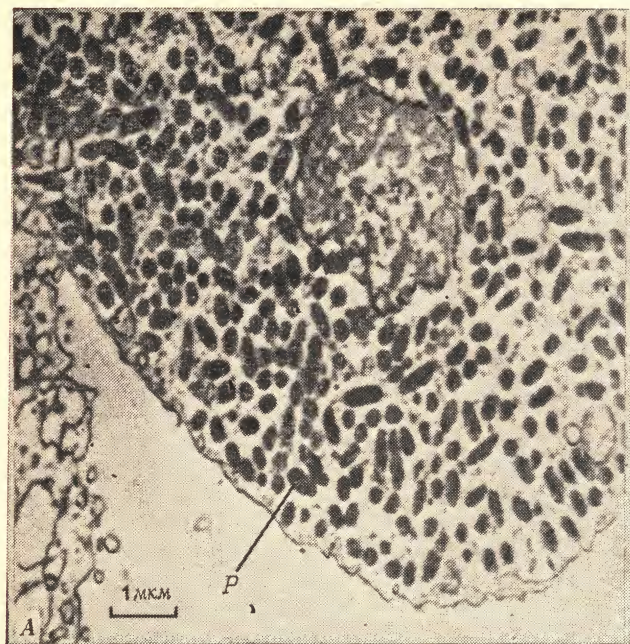
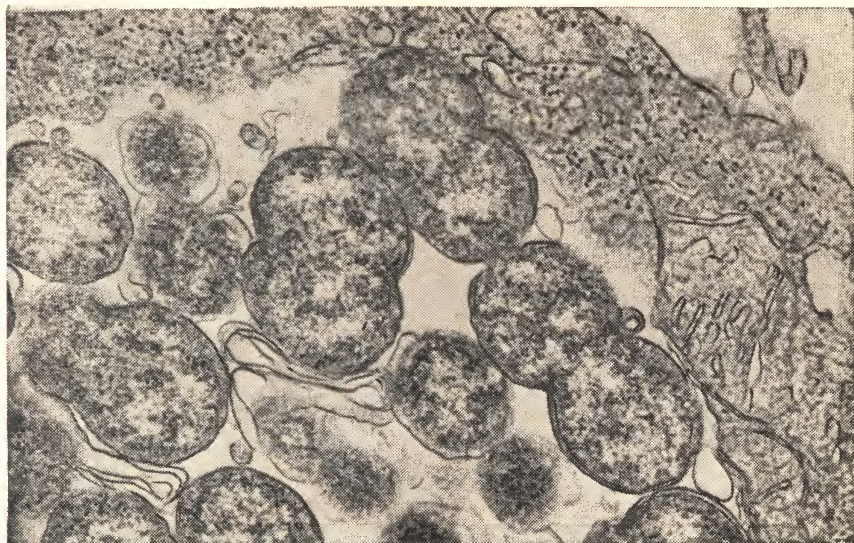


Рис. 5.55. Электронные микрофотографии ультратонких срезов тканей куриного эмбриона, инфицированных риккетсиями. А. Отдельная клетка эмбриона на поздней стадии инфекции; $\times 10\,026$. Вся цитоплазма заполнена палочковидными клетками риккетсий (P); расположенное в центре ядро выглядит аномальным, но не инфицировано. Б. Участок инфицированной клетки эмбриона при большом увеличении ($\times 57\,031$). Видны несколько риккетсий в продольном разрезе (P), а также митохондрия (M) — примерно такой же величины, что и клетки риккетсий. [Wisig S. L., Caro L. G., Jackson E. B., Sma-del J. E., Electron-microscopic observations on intracellular rickettsiae, Am. J. Pathol., 32, 1117 (1956).]

Рис. 5.56. Электронная микрофотография ультратонкого среза части клетки млекопитающего, растущей в культуре и инфицированной множеством хламидий;

×31 185. Каждая из мелких округлых или овальных клеток хламидий окружена элементарной мембраной; многие клетки находятся в стадии бинарного деле-

ния. (Фото предоставлено Р. Фринсом, отделение микробиологии Чикагского университета.)



В связи с очень малой величиной хламидий трудно установить характер их роста в клетке хозяина; остается спорным вопрос о том, размножаются ли они бинарным делением или почкованием. Химический анализ выявил присутствие в их клетках ДНК и РНК, а также компонентов пептидогликана. Хотя биохимические данные говорят о наличии у хламидий разнообразных ферментативных функций, их способность осуществлять энергетический обмен еще не доказана. Это привело к интересной гипотезе, что они являются «энергетическими паразитами», рост которых всецело зависит от снабжения богатыми энергией продуктами, образующимися в процессе метаболизма клетки хозяина.

СПИРОХЕТЫ

Спирохеты — небольшая группа хемогетеротрофных бактерий, легко отличимых от всех других грамотрицательных форм по строению клеток. Клетка у них очень сильно вытянута в длину, имеет спиральную форму и окружена тонкой, гибкой стенкой. Все спирохеты способны активно плавать в жидкой среде с помощью системы аксиальных фибрилл, описанных на стр. 185. В процессе движения клетки часто образуют петли и витки, все время сохраняя при этом свою

Рис. 5.57. Некоторые представители крупных спирохет. А. Живая *Cristispira*, паразитирующая в кристаллическом столбике моллюсков. Фазовый контраст; $\times 380$. (Фото предоставлено

С. Уотсоном). Б. Препарат неидентифицированной водной спирохеты, окрашенный нигрозином; $\times 341$. В. Окрашенный нигрозином препарат *Spirochaeta plicatilis* — крупной спирохеты, час-

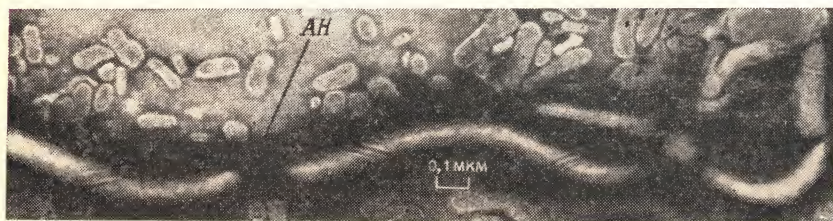
то встречающейся в воде; $\times 341$. На препарате видны также клетки палочковидных бактерий. (Фото предоставлены С. Робинсу.)



Рис. 5.58. Электронная микрофотография делящейся клетки спирохеты *Treponema microdentium*. Негативная окраска; $\times 46\,200$. На-

чинается разделение дочерних клеток, которые еще соединены фибриллами аксиальной нити (АН). [Listgarten M. A., Socransky S. S., Electron

microscopy of axial fibrils, outer envelope and cell division of certain oral spirochètes, J. Bacteriol., 88, 1087 (1964).]



собственную спиральную структуру (рис. 5.57). Размножаются они бинарным делением; покоящиеся стадии не известны.

У различных представителей этой группы число фибрилл варьирует в широких пределах и более или менее пропорционально величине клетки. У самых мелких спирохет к каждому из полюсов прикреплено только по одной фибрилле. У очень крупных форм, таких, как *Cristispira*, их несколько сотен. Делению клетки (рис. 5.58) предшествует деление протопласта внутри одевающей его стенки. Затем разделяется клеточная стенка, и две дочерние особи расходятся; каждая из них получает один из двух наборов фибрилл, составляющих аксиальную нить (аксостиль). Новая точка инициации и новый набор фибрилл возникают на вновь образованном полюсе каждой из дочерних клеток.

Свободноживущие спирохеты (*Spirochaeta*) — обитатели ила и воды; большинство из них, по-видимому, анаэробы, так как они встречаются обычно в бескислородных участках этих местообитаний. Представители рода *Cristispira* паразитируют у двустворчатых и других моллюсков. Они накапливаются, часто в огромном количестве, в *кристаллическом столбике* — студенистом стержне, который находится в мешочке, соединенном с пищеварительным трактом. Многие из более мелких спирохет — паразиты человека и других позвоночных; среди них есть возбудители болезней человека — сифилиса и фрамбезии (*Treponema*), возвратного тифа (*Borrelia*) и одного из видов инфекционной желтухи (*Leptospira*).

Представители рода *Leptospira* легко поддаются культивированию, хотя их сложные потребности в питательных веществах полностью не выяснены. Им необходимы некоторые витамины и ненасыщенные жирные кислоты. Эти организмы — облигатные аэробы с дыхательным типом энергетического обмена. Многие из патогенных трепонем и боррелий еще не удается поддерживать в культуре; те же, которые можно выращивать, являются облигатными анаэробами, получающими энергию путем сбраживания углеводов или аминокислот. Культивируют и некоторые свободноживущие водные виды *Spirochaeta*; это облигатные или факультативные анаэробы, сбраживающие углеводы, и их потребности в питательных веществах относительно сложны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показывает сделанный нами обзор, биологическое разнообразие прокариот настолько велико, что здесь очень трудно выделить ряд крупных, четко разграниченных групп, подобных основным группам протистов. Кажется вероятным, что современные прокариоты — это результат многочисленных эволюционных линий, развивавшихся независимо друг от

друга в течение значительного периода биологической эволюции. Среди них можно найти некоторое число характерных групп, в каждой из которых все представители имеют много общих признаков, так что можно предполагать их общее происхождение. Примером могут служить цианобактерии и миксобактерии, способные к образованию плодовых тел. Однако попытка установить *межгрупповые* эволюционные взаимоотношения, как это было сделано для протистов в гл. 4, представляется безнадежной. Единственная общая особенность всех этих организмов — то, что структурной и функциональной единицей у них является прокариотическая клетка. Хотя это, несомненно, говорит об их общем первоначальном происхождении, последующая дивергенция была слишком значительной и слишком давней, чтобы можно было реконструировать эволюционные взаимосвязи, основываясь на признаках современных представителей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Buchanan R. E., Gibbons N. E. (eds.), 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Baltimore, Williams & Wilkins.
 Fogg G. E., Stewart W. D. P., Fay P., Walsby A. F., 1973, *The Blue-Green Algae*, London and New York, Academic Press.
 Hayflick L. (ed.), 1969, *The Mycoplasmatales and the L-Phase of Bacteria*, New York, Appleton-Century-Crofts.
 Smith P. F., 1971, *The Biology of Mycoplasmas*, New York, Academic Press.

Обзоры

- Dworkin M. (1966), *Biology of the Myxobacteria*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 20, 75.
 Lechevalier H. A., Lechevalier M. P. (1967), *Biology of Actinomycetes*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 71.
 Maniloff J., Morowitz H. J. (1972), *Cell Biology of the Mycoplasmas*, *Bacteriol. Revs.*, 36, 263.
 Moulder J. W. (1966), *The Relation of the Psittacosis Group (Chlamydiae) to Bacteria and Viruses*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 20, 107.
 Pfennig N. (1967), *Photosynthetic Bacteria*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 285.
 Schmidt J. L. (1972), *Prosthecae Bacteria*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 25, 93.
 Starr M. P., Skerman V. B. D. (1965), *Bacterial Diversity: The Natural History of Selected Morphologically Unusual Bacteria*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 19, 407.

6 МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ: ОБРАЗОВАНИЕ АТФ

Совокупность всех химических превращений, происходящих в клетках, называется *метаболизмом*. Некоторые из превращений обеспечивают синтез макромолекул, составляющих основную массу клетки, из более простых соединений, присутствующих во внеклеточной среде. Такой метаболизм называется *биосинтезом*¹. Многие реакции биосинтеза требуют активации реагирующих веществ, перевода их в состояние с более высоким уровнем энергии (т. е. для биосинтеза необходимо поступление энергии). Поэтому важную часть метаболизма любого организма составляет мобилизация химической энергии для поддержания биосинтеза. Обычно химическая энергия запасается в форме АТФ — вещества с высокой реакционной способностью.

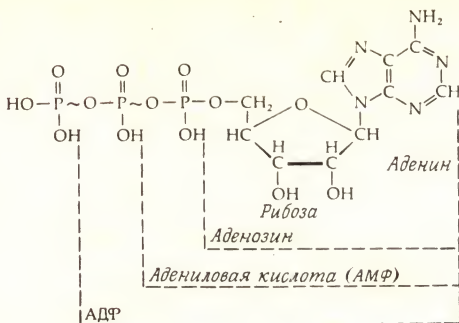
Хотя механизмы биосинтеза одинаковы у всех организмов, механизмы образования АТФ различаются. В процессе фотосинтеза энергия света может быть превращена в химическую энергию, обеспечивающую биосинтетические процессы клетки. Может быть также использована химическая энергия в виде неорганических или органических соединений; процессы расщепления, идущие с выделением энергии, называются *катаболизмом*.

НЕКОТОРЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ

Второй закон термодинамики гласит, что только часть энергии, высвобождающейся в ходе химической реакции и называемой *свободной энергией* (ΔG), доступна для преобразования в работу; остальная энергия теряется из-за увеличения *энтропии* (неупорядоченности системы). Химические реакции возможны только в том случае, когда изменение свободной энергии, ΔG , отрицательно. Знак ΔG показывает, может ли идти данная реакция, а численное значение ΔG зависит от концентрации реагирующих веществ и продуктов в реакционной смеси. При молярной концентрации всех реагирующих веществ величина ΔG называется *стандартной свободной энергией* ΔG° ; она связана с константой равновесия реакции K_p следующим уравнением:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_p, \quad (6.1)$$

Рис. 6.1. Структура АТФ (аденозинтрифосфата). Показаны различные компоненты молекулы, которые могут быть получены при гидролизе.



где R — газовая константа, а T — абсолютная температура. Таким образом, если ΔG° реакции отрицательна, то константа равновесия (K_p) больше 1,0 и реакция сдвинута в сторону образования продукта; если же она положительна, то K_p меньше 1,0 и реакция идет преимущественно в обратном направлении.

Величину ΔG° для данной реакции можно вычислить, исходя из константы равновесия реакции [уравнение (6.1)]. Ее можно рассчитать также как разность между *стандартной свободной энергией продуктов и стандартной свободной энергией реагирующих веществ* при условии, что каждая величина приведена к стехиометрическим условиям уравнения реакции, т. е.

$$\Delta G^\circ = \sum G^\circ_{\text{продуктов}} - \sum G^\circ_{\text{реагирующих веществ}} \quad (6.2)$$

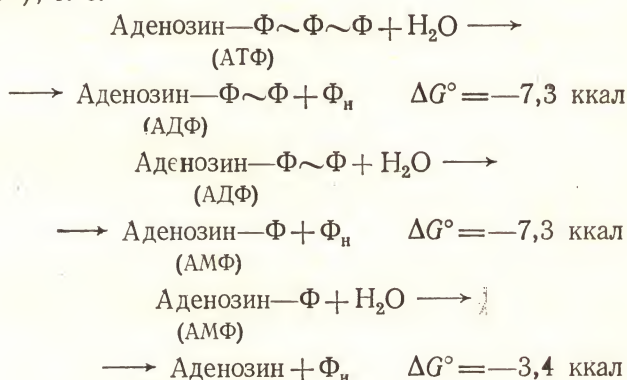
РОЛЬ АТФ В БИОСИНТЕЗЕ

Все биосинтетические реакции требуют участия аденозинтрифосфата (АТФ), химическая структура которого показана на рис. 6.1. Это производное аденозинмонофосфата (АМФ), к которому присоединены еще две фосфатные группы при помощи *ангидридных связей*. Две связи, обозначенные символом \sim , представляют собой связи, богатые энергией¹, обладающие особенно высокой реакционной способностью. Отсюда следует, что АТФ может служить донором фосфатной группы для множества метаболических интермедиатов (промежуточных продуктов) и способен переводить их таким образом в активированную форму. Стандартная свободная энергия интермедиатов при этом повышается настолько, что позволяет им в фосфорилированной форме участвовать в термодинамически выгодных реакциях биосинтеза ($-\Delta G^\circ$), в то

¹ Не следует путать термин «богатые энергией связи» с термином «энергия связи», который применяется для обозначения энергии, необходимой для разрыва связи между двумя атомами.

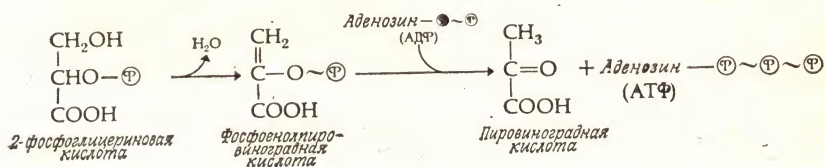
время как подобная реакция с участием нефосфорилированной формы реагирующего вещества была бы термодинамически невыгодной ($+\Delta G^\circ$). Таким образом, образование АТФ необходимо для осуществления биосинтетических реакций.

Повышенная реакционная способность богатых энергией связей АТФ становится очевидной, если сравнить ΔG° гидролиза этих связей с ΔG° отщепления фосфата АМФ (присоединенного к аденозину эфирной связью и, следовательно, менее реакционноспособного; такая связь называется низкоэнергетической), т. е.



ОБРАЗОВАНИЕ АТФ

АТФ образуется в результате двух принципиально различающихся процессов клеточного метаболизма: *субстратного фосфорилирования* и *транспорта электронов*. При фосфорилировании на уровне субстрата АТФ образуется из АДФ путем переноса богатой энергией фосфатной группы от интермедиата катаболизма. Примером может служить следующая реакция:



В результате удаления молекулы воды бедная энергией эфирная связь фосфата 2-фосфоглицериновой кислоты превращается в богатую энергией енольную связь фосфоенолпировиноградной кислоты. Этот фосфат с богатой энергией связью переносится на АДФ, и в результате образуется молекула АТФ.

Все остальные процессы образования АТФ протекают в мембранах благодаря тому, что происходит перенос электронов между определенными молекулами переносчиков, ориен-

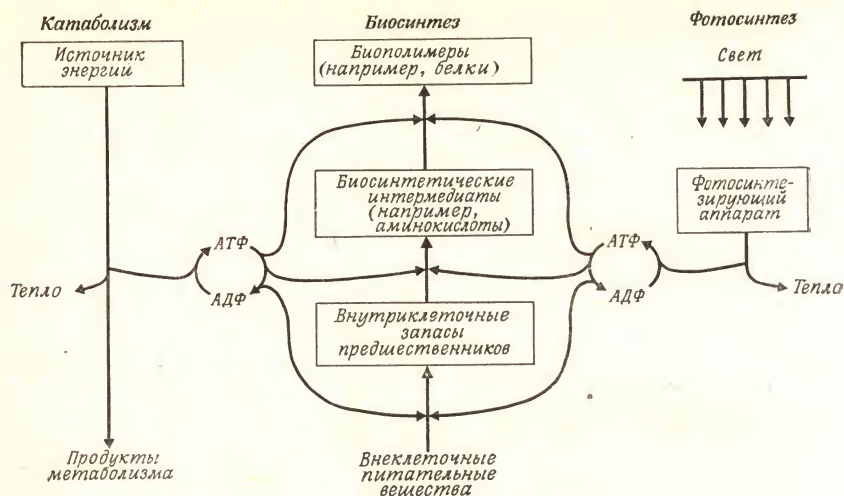


Рис. 6.2. Схема, иллюстрирующая роль АТФ в сопряжении катабо-

лизма и фотосинтеза с биосинтезом.

тация которых в мембране фиксирована. Механизм образования АТФ при транспорте электронов мы рассмотрим в одном из следующих разделов настоящей главы.

Образование АТФ представляет собой основной механизм, с помощью которого запасается и сохраняется некоторое количество свободной энергии; реально большая часть энергии рассеивается в виде тепла. Роль АТФ в обеспечении энергией биосинтетических процессов схематически показана на рис. 6.2.

ДРУГИЕ СОЕДИНЕНИЯ С БОГАТЫМИ ЭНЕРГИЕЙ СВЯЗЯМИ

Мы отметили первостепенную роль АТФ в «улавливании» части свободной энергии, которая становится доступной при катаболических реакциях, и роль АТФ в поддержании биосинтетических реакций путем фосфорилирования и, следовательно, активации некоторых промежуточных метаболитов биосинтеза. Часть этих промежуточных метаболитов биосинтеза также содержит богатые энергией связи. АТФ непосредственно участвует в большинстве таких реакций активации, вместе с тем на определенных этапах биосинтеза в них участвуют и другие химически активные специфические метаболиты, содержащие богатые энергией связи. Все богатые энергией соединения могут образоваться за счет затраты одной или двух богатых энергией связей АТФ, но иногда они образуются непосредственно в катаболических реакциях. Эти со-

ТАБЛИЦА 6.1

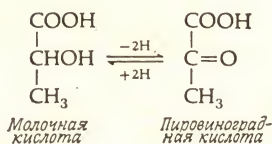
БОГАТЫЕ ЭНЕРГИЕЙ СОЕДИНЕНИЯ (ПОМИМО АТФ), АКТИВИРУЮЩИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИНТЕРМЕДИАТЫ И ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ТАКИМ ОБРАЗОМ ПРОТЕКАНИЕ НЕКОТОРЫХ РЕАКЦИЙ БИОСИНТЕЗА

Богатые энергией соединения	Обеспечивает активацию предшественника для биосинтеза следующих молекул
Гуанозин—Ф ~ Ф ~ Ф (ГТФ)	Белки
Уридин—Ф ~ Ф ~ Ф (УТФ)	Пептидогликаны клеточной стенки бактерий
Цитидин—Ф ~ Ф ~ Ф (ЦТФ)	Фосфолипиды
Дезокситимидин—Ф ~ Ф ~ Ф (дТТФ)	Липополисахариды клеточной стенки бактерий
Ацил ~ S — КоА (ацилкофермент А)	Жирные кислоты

единения перечислены в табл. 6.1 вместе с примерами реакции активации, в которых они участвуют.

РОЛЬ ПИРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ

Как и все остальные реакции окисления, биологическое окисление органических метаболитов представляет собой удаление электронов. В большинстве случаев на каждой стадии окисления метаболита происходит удаление двух электронов и одновременно потеря двух протонов. Этот процесс эквивалентен отнятию двух атомов водорода и называется *дегидрированием*. Наоборот, *восстановление* какого-либо метаболита представляет собой присоединение двух электронов и двух протонов и, следовательно, его можно рассматривать как *гидрирование*. Например, окисление молочной кислоты до пировиноградной и восстановление пировиноградной кислоты до молочной можно выразить следующим уравнением:



Посредниками в реакциях биологического окисления и восстановления (т. е. акцепторами освобождающихся атомов водорода в реакциях дегидрирования и донорами необходимых атомов водорода в реакциях гидрирования) чаще всего являются два пиридиновых нуклеотида: никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), структура которых изображена на рис. 6.3.

Оба эти пиридиновых нуклеотида легко могут претерпевать обратимое окисление и восстановление никотинамидной

Рис. 6.3. Структура НАД (никотинамидадениндинуклеотида). НАДФ (никотинамидаденинди-

нуклеотидфосфат) имеет дополнительную фосфатную группу, связанную эфирной связью в

2'-положении рибозы аденилового остатка молекулы (показано стрелкой).

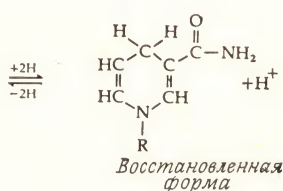
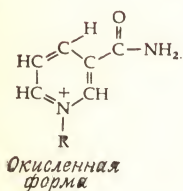
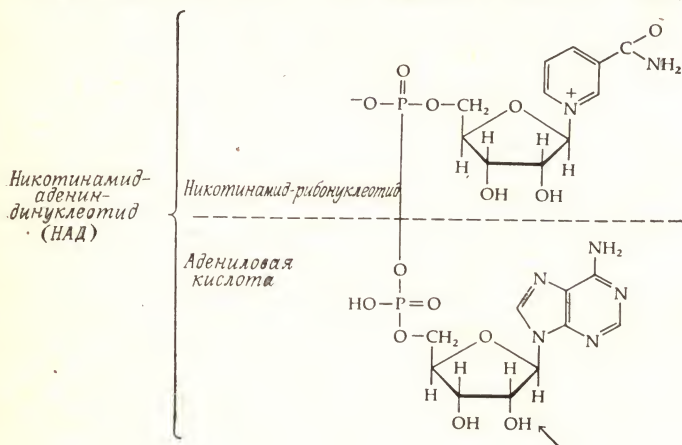
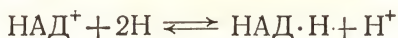


Рис. 6.4. Окисленная и восстановленная формы никотинамидного остатка пиридиновых нуклеотидов.

группы (рис. 6.4). Окисленная форма пиридиновых нуклеотидов содержит на один атом водорода меньше, чем восстановленная форма; кроме того, она имеет положительный заряд, позволяющий ей акцептировать при восстановлении второй электрон. Обратимые реакции окисления — восстановления НАД и НАДФ можно записать следующим образом:



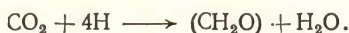
и



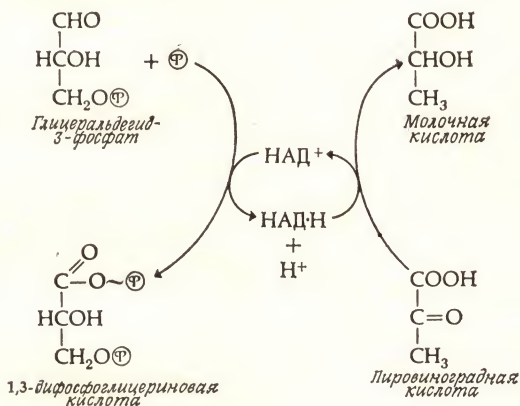
Функция пиридиновых нуклеотидов в метаболизме состоит в переносе восстановительного потенциала или в его образовании. Что касается углерода, то общая средняя степень окисления органических соединений клетки соответствует углеводам (она может быть записана в виде $[\text{CH}_2\text{O}]$). Поэтому хемогетеротрофные организмы, использующие глюкозу или другие источники углерода с той же степенью окисления, не нуждаются вообще или нуждаются лишь в небольшой степени в восстановительной способности для усвоения углерода при синтезе материала клетки. У этих организмов роль

пиридиновых нуклеотидов сводится к переносу восстановительного потенциала. Однако организмы, использующие в качестве единственного источника углерода CO_2 (т. е. растения или автотрофные бактерии), должны обладать для ассимиляции углерода большим восстановительным потенциалом.

У этих организмов основная роль пиридиновых нуклеотидов состоит в образовании восстановительного потенциала. Вообще говоря, для усвоения каждой молекулы CO_2 — ее восстановления до уровня окисления клеточного материала — необходимы четыре атома водорода:



При переносе восстановительной способности пиридиновые нуклеотиды выступают как факторы сопряжения дегидрирования субстратов и транспорта электронов. Они обеспечивают также сопряжение окисления одного метаболического интермедиата с восстановлением другого (например, НАД участвует в сопряжении окисления фосfogлицеринового альдегида с восстановлением пировиноградной кислоты в клетках молочнокислых бактерий).



При образовании восстановительного потенциала электроны, освобождающиеся при окислении неорганических соединений или в ходе фотосинтеза, непосредственно восстанавливают пиридиновые нуклеотиды.

ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА, ПРИВОДЯЩИЕ К ОБРАЗОВАНИЮ АТФ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ПРИРОДА БРОЖЕНИЯ

Из трех основных путей образования АТФ простейшим по механизму является брожение. Брожение можно определить как метаболический процесс, приводящий к образованию

АТФ, при котором органические соединения служат как донорами электронов (при этом они окисляются), так и акцепторами электронов (при этом они восстанавливаются). Соединения, выполняющие эти две функции, обычно являются различными метаболитами, которые образуются из одного субстрата, подвергающегося брожению (например, из сахара). При брожении субстрат превращается в смесь конечных продуктов, причем некоторые из них находятся в более окисленном состоянии, а некоторые — в более восстановленном (т. е. при брожении всегда сохраняется строгое равновесие окисления и восстановления). Средняя степень окисления конечных продуктов такая же, как и субстрата; это легко видеть в случае спиртового брожения глюкозы (табл. 6.2).

ТАБЛИЦА 6.2
СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ

Суммарное уравнение реакции	$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow$	$2CO_2$	$+$	$2C_2H_5OH$
	Глюкоза (субстрат)			Этанол (конечный продукт)
Степень окисления углерода	0	+4		-2
Баланс окисления и восстановления	6×0	$= 2 \times 4 + 2 [2 \times (-2)]$		

Требование точного окислительно-восстановительного равновесия ограничивает круг органических соединений, которые могут расщепляться путем брожения: они не должны быть ни слишком сильно восстановлены, ни слишком сильно окислены. Основные субстраты брожения — углеводы. Бактерии могут сбраживать также некоторые вещества, относящиеся к другим классам химических соединений: органические кислоты, аминокислоты, пурины и пиримидины.

Единственный возможный способ синтеза АТФ при брожении — субстратное фосфорилирование.

Пастер, который первым оценил физиологическое значение брожения, назвал его «следствием жизни без воздуха». Это положение верно до сих пор: все процессы брожения могут происходить только в строго анаэробных условиях. Многие организмы, образующие АТФ путем брожения, — строгие анаэробы (физиологические причины, по которым они не могут расти в присутствии воздуха, будут рассмотрены в гл. 10). Другие — факультативные анаэробы, они способны расти и в присутствии, и в отсутствие воздуха. Как правило, у факультативных анаэробов под действием воздуха изменяется способ образования АТФ: присутствие молекулярного кислорода индуцирует переключение метаболизма с брожения на дыхание (см. ниже). Однако группа молоч-

нокислых бактерий — факультативных анаэробов — представляет собой интересное исключение из этого правила: в присутствии кислорода способ образования АТФ у них не меняется. Брожение продолжается даже в присутствии воздуха.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ПРИРОДА ДЫХАНИЯ

Дыхание можно определить как *метаболический процесс, идущий с образованием АТФ*, в ходе которого органические или неорганические соединения служат донорами электронов (они при этом окисляются), а акцепторами электронов обязательно служат неорганические соединения (они при этом восстанавливаются). Обычно конечным акцептором электронов служит молекулярный кислород. Однако при *анаэробном дыхании*, особом классе дыхательных процессов, характерном для небольшого числа бактерий, в качестве конечного акцептора электронов выступают неорганические соединения, отличные от кислорода, — сульфаты, нитраты и карбонаты. Чтобы отличать дыхательный процесс с участием кислорода от такого анаэробного дыхания, удобно называть первый *аэробным дыханием*.

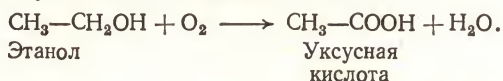
Многие микроорганизмы, осуществляющие аэробное дыхание, — строгие аэробы. Однако некоторые из них относятся к факультативным анаэробам, поскольку они могут также образовывать АТФ путем брожения (как указано выше) или при анаэробном дыхании, используя нитрат в качестве акцептора электронов. Бактерии, использующие при анаэробном дыхании сульфат или карбонат в качестве акцепторов электронов, — строгие анаэробы; они не способны к аэробному дыханию в качестве альтернативного способа образования АТФ.

Круг органических веществ, которые могут подвергаться расщеплению при дыхании, очень широк; необходимо только, чтобы степень их окисления была меньше, чем степень окисления CO_2 . Поэтому микроорганизмы могут использовать в качестве источника дыхания любое природное органическое соединение. Однако некоторые синтезированные человеком соединения (гл. 25) удивительно устойчивы к дыхательному метаболизму микробов и, следовательно, накапливаются в окружающей среде, что часто влечет за собой нежелательные экологические последствия.

Отличительная особенность большинства дыхательных процессов — присутствие в клетке специального набора соединений, способных подвергаться обратимому окислению и восстановлению, т. е. способных акцептировать электроны от одного соединения и отдавать их другому. Они образуют *цепь переноса электронов*. Электроны, отнятые от субстрата, поступают в эту цепь, переходят от одного соединения-пере-

носчика к другому и обязательно достигают конечного неорганического акцептора электронов (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} или CO_3^{2-}). В ходе этого процесса образуется АТФ; механизм его образования будет обсуждаться ниже в настоящей главе. Такой способ образования АТФ называется *окислительным фосфорилированием*.

В процессе дыхания органические соединения обычно полностью окисляются до CO_2 . Однако некоторые бактерии, в частности уксуснокислые бактерии, лишь частично окисляют субстраты; примером такого неполного окисления служит образование уксусной кислоты из этанола:



Изменение свободной энергии при полном окислении какого-либо органического соединения гораздо больше, чем при его сбраживании. Например, при полном окислении 1 моля глюкозы освобождается 688 ккал, в то время как большинство путей сбраживания этого сахара дает всего 1/10 этого количества энергии. Субстратное фосфорилирование, характерное для сбраживания органических соединений, происходит также и при расщеплении органических соединений в процессе дыхания, но значительно большее количество АТФ образуется при окислительном фосфорилировании. В соответствии с этим общий выход АТФ на 1 моль субстрата, окисленного при дыхании, значительно выше, чем при метаболизме того же соединения путем брожения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ПРИРОДА ФОТОСИНТЕЗА

Третий (и наиболее сложный по механизму) способ образования АТФ — это *фотосинтез*, где в качестве источника энергии используется свет. Исторически термин «фотосинтез» использовался вначале для описания общего метаболизма растений, водорослей и цианобактерий, который можно представить следующей реакцией:



где (CH_2O) означает органические соединения со степенью окисления, соответствующей средней степени окисления в клетке.

Эта реакция не описывает процесс, в ходе которого образуется АТФ, а отражает его следствие в биосинтезе: превращение CO_2 в органические вещества клетки под действием света. АТФ образуется при переносе энергии света, поглощенного фотосинтетической пигментной системой, — этот процесс называется *фотофосфорилированием*. Его механизм аналогичен окислительному фосфорилированию — в данном

случае АТФ также образуется при прохождении электронов через цепь переноса электронов. При фотосинтетическом метаболизме не происходит субстратного фосфорилирования, в результате которого при брожении образуется весь АТФ, а при дыхании его часть.

Фотосинтезирующие организмы используют в качестве основного источника углерода CO_2 , поэтому их метаболизм требует значительного восстановительного потенциала. Большинство фотосинтезирующих организмов (растения, водоросли и цианобактерии) используют в качестве единственного источника восстановителя воду; сопутствующее фотосинтезу окисление воды приводит к образованию O_2 . Такой фотосинтез называется *кислородным фотосинтезом*.

Некоторые фотосинтезирующие прокариоты (пурпурные и зеленые бактерии) не могут использовать в качестве конечного восстановителя воду и их фотосинтетический метаболизм никогда не сопровождается образованием O_2 . Вместо этого они используют в качестве восстановителей другие восстановленные неорганические соединения (например, H_2S или H_2). Некоторые пурпурные и зеленые бактерии используют в качестве основного источника углерода вместо CO_2 другие органические соединения; у этих бактерий уже нет особой необходимости в восстановительном потенциале для биосинтеза. Такой тип фотосинтетического метаболизма называют *бескислородным фотосинтезом*.

Молекулярный кислород (O_2) не участвует в реакциях образования АТФ ни в одном из этих типов фотосинтеза. Следовательно, в принципе любой фотосинтез может происходить в строго анаэробных условиях. Однако все организмы, осуществляющие кислородный фотосинтез, являются аэробами в том смысле, что они должны быть жизнеспособны в присутствии кислорода. То, что фотосинтез по своей природе анаэробен, становится очевидным при изучении организмов с бескислородным фотосинтезом. Большинство этих организмов — строгие анаэробы; у тех немногих из них, которые являются факультативными аэробами, в присутствии кислорода фотосинтетическое образование АТФ подавляется, оно заменяется образованием АТФ путем дыхания.

БИОХИМИЯ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ У ГЕТЕРОТРОФОВ

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

Некоторые катаболические реакции являются общими для дыхательного метаболизма и брожения. К ним относятся три пути превращения сахаров в ключевой интермедиат метаболизма — пировиноградную кислоту. Это *путь Эмбдена — Мей-*

ергофа (который также называют *гликолизом*), *пентозофосфатный путь* (который также называют *гексозофосфатным шунтом*) и *путь Энтнера — Дудорова*. Первые два пути осуществляются у многих организмов, как прокариот, так и эукариот. Третий путь возможен лишь у некоторых групп прокариот.

В начальных реакциях пути Эмбдена — Мейергофа (рис. 6.5) две молекулы АТФ затрачиваются на образования фруктозо-1,6-дифосфата. Он расщепляется на триозофосфаты — фосfogлицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат, которые легко превращаются друг в друга. Окисление триозофосфата, сопряженное с восстановлением НАД, сопровождается этерификацией неорганического фосфата и образованием молекулы 1,3-дифосfogлицериновой кислоты из каждого трехуглеродного фрагмента. На последующих этапах превращения этого соединения в пировиноградную кислоту обе фосфатные группы переносятся на АДФ (субстратное фосфорилирование), так что на каждую использованную молекулу глюкозы образуется 4 молекулы АТФ. Поскольку на начальных этапах активации затрачивается 2 молекулы АТФ, общий выход составляет 2 молекулы АТФ на моль глюкозы, подвергающейся брожению; кроме того, образуется 2 молекулы НАД·Н.

Пентозофосфатный путь не приводит непосредственно к образованию пировиноградной кислоты; он только обеспечивает окисление одного из углеродных атомов субстрата (рис. 6.6). Он включает начальное фосфорилирование глюкозы и последующее окисление продукта, глюкозо-6-фосфата, сопряженное с восстановлением НАДФ и образованием 6-фосfogлюконовой кислоты. Затем глюкозо-6-фосфат участвует в реакциях, включающих два окислительных этапа с участием НАДФ и декарбоксилирование и приводящих к образованию пентозофосфата D-рибулозо-5-фосфата. Из него образуются путем эпимеризации D-ксилулозо-5-фосфат и D-рибозо-5-фосфат. После образования D-рибозо-5-фосфата и D-ксилулозо-5-фосфата начинается цепь транскетолазных реакций (перенос двухуглеродной гликоальдегидной группы $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$) и трансальдолазных реакций (перенос трехуглеродной диоксиацетоновой группы $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{CHOH}-$), приводящих в конце концов к исходному продукту всей последовательности реакций глюкозо-6-фосфату. Таким образом, этот метаболический путь цикличен по самой своей природе. Прохождение шести молекул через цикл приводит к полному окислению одной молекулы глюкозо-6-фосфата до CO_2 и восстановлению шести молекул НАДФ⁺ в НАДФ·Н.

Пентозофосфатный путь выполняет две жизненно важные метаболические функции: он обеспечивает образование D-рибозо-5-фосфата, необходимого для синтеза нуклеиновых кис-

Рис. 6.5. Путь
Эмбдена—Мей-
ергофа: превра-
щение глюкозы
в пировино-
градную кисло-
ту (гликолиз).

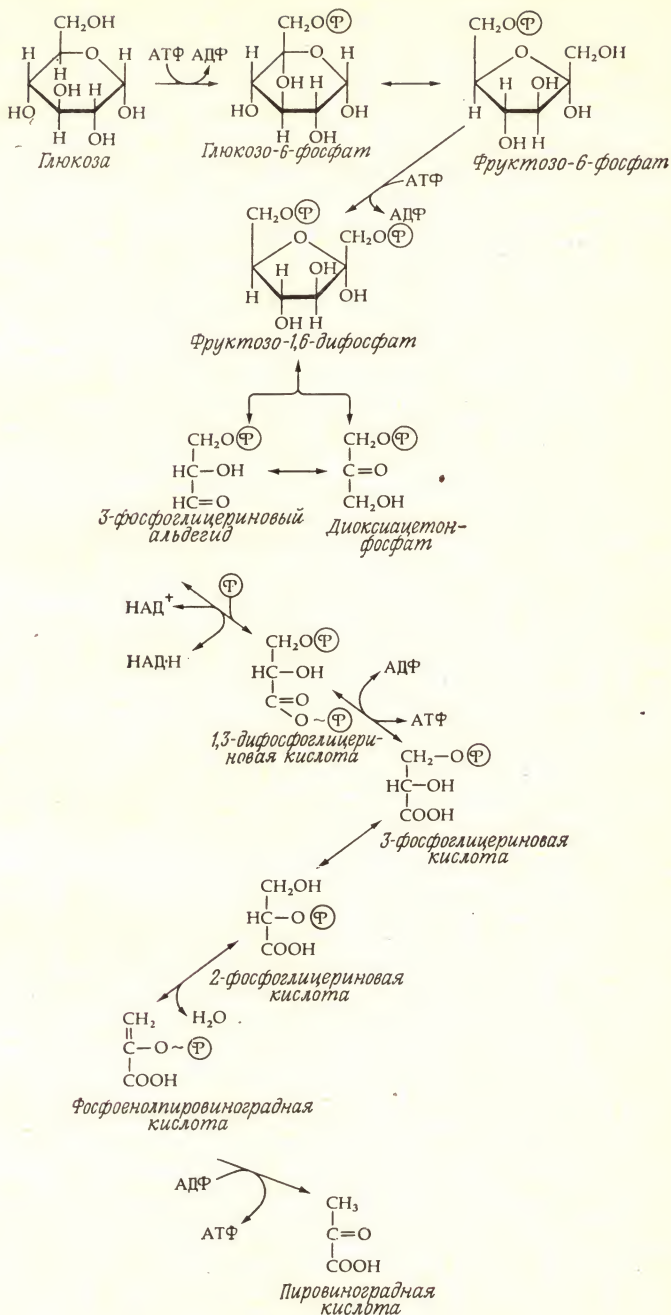
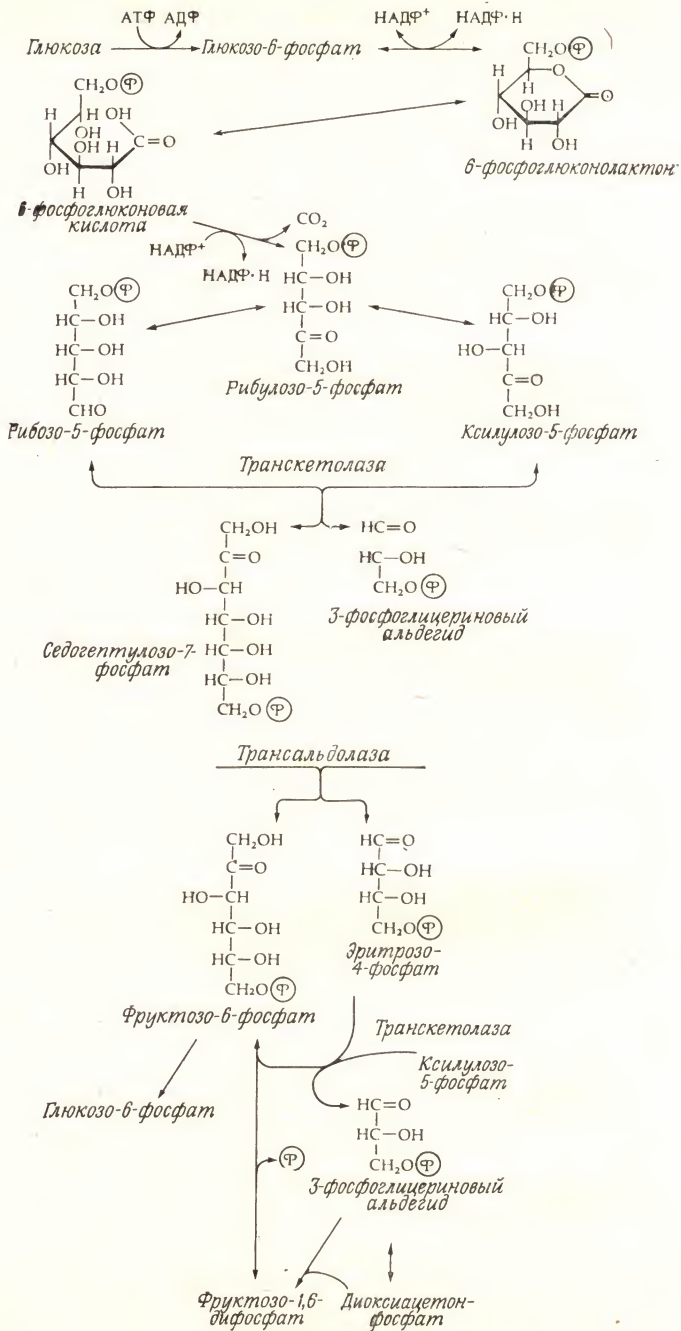


Рис. 6.6. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы.



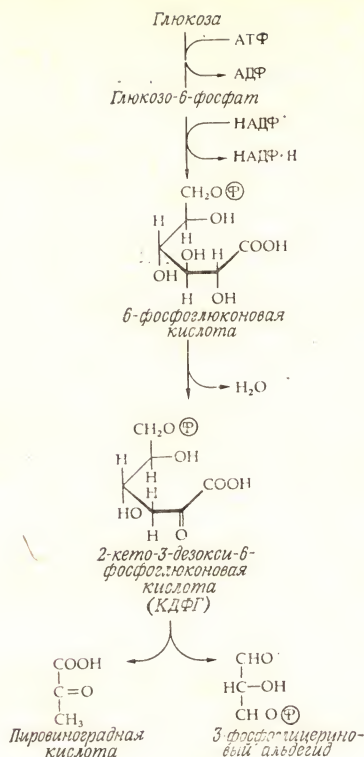


Рис. 6.7. Путь Энтнера—Дудорова: превращение глюкозы в пировиноградную кислоту и 3-фосфоглицериновый альдегид.

лот (гл. 7) и большей части НАДФ·Н, необходимого клетке для различных биосинтетических реакций.

Первый интермедиат пути Энтнера—Дудорова — глюкозо-6-фосфат (рис. 6.7). После окисления 6-фосфоглюконовой кислоты и ее дегидратации образуется интермедиат, характерный только для пути Энтнера—Дудорова — 2-кето-3-деокси-6-фосфоглюконовая кислота (КДФГ). Она расщепляется на молекулу пировиноградной кислоты и молекулу 3-фосфоглицеринового альдегида, который подвергается действию ферментов пути Эмбдена—Мейергофа и превращается во вторую молекулу пировиноградной кислоты. Общий выход при расщеплении одной молекулы глюкозы в последовательности реакций пути Энтнера—Дудорова составляет 1 молекулу АТФ и 2 молекулы НАДФ·Н.

ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

Помимо ряда специфических ферментативных реакций, в которые вступает пировиноградная кислота, она окисляется в циклической последовательности реакций, называемой циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) (рис. 6.8). Этот цикл

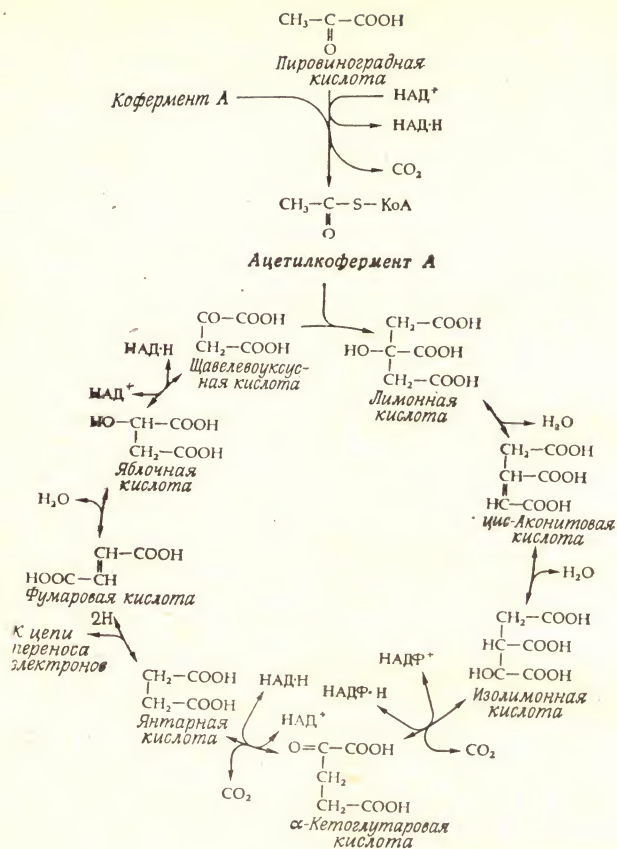
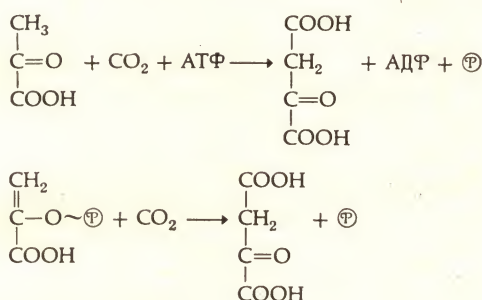


Рис. 6.8. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), в ходе которого окисляется пировиноградная кислота.

представляет собой основной путь образования АТФ у аэробов (в результате окислительного фосфорилирования во время транспорта электронов от $\text{НАД\text{H}}$ до конечного акцептора электронов). В ЦТК образуется ряд интермедиатов, необходимых для биосинтетических процессов, поэтому даже строгие анаэробы обладают большинством ферментов этого цикла, кроме фермента, катализирующего превращение α -кетоглутаровой кислоты в янтарную. Благодаря реакциям, идущим в обратном направлении от щавелевоуксусной кислоты до янтарной кислоты, и прямым реакциям ЦТК от лимонной кислоты до α -кетоглутаровой эти организмы могут синтезировать все интермедиаты даже в анаэробных условиях. ЦТК приводит к полному окислению одной молекулы уксусной кислоты до CO_2 , а также к образованию трех молекул восстановленных пиридиновых нуклеотидов, одной молекулы ГТФ и одной пары электронов, поступающих в цепь переноса электронов, в которой не участвуют пиридиновые нуклео-

Если бы функция ЦТК сводилась только к полному окислению уксусной кислоты (ацетильных остатков), образовавшейся из исходных субстратов, то он мог бы протекать без добавления щавелевоуксусной кислоты, так как роль этого соединения была бы чисто каталитической. Однако, как было указано выше, в ЦТК образуются также интермедиаты для различных биосинтетических процессов. Поэтому в действительности в растущем организме цикл никогда не бывает замкнутым и поддержание реакций ЦТК требует дополнительного синтеза щавелевоуксусной кислоты. Она обычно образуется путем карбоксилирования пировиноградной или фосфоенолпировиноградной кислоты:



В результате углерод пировиноградной кислоты поступает в ЦТК двумя путями: через щавелевоуксусную кислоту и через ацетил-S-КоА.

РОЛЬ ГЛИОКСИЛАТНОГО ЦИКЛА В ОКИСЛЕНИИ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Непосредственное окисление уксусной кислоты или окисление исходных субстратов (например, высших жирных кислот), которые превращаются в ацетил-S-КоА без промежуточного образования пировиноградной кислоты, обеспечивает модифицированная форма ЦТК, известная под названием глиоксилатного цикла. В этих случаях щавелевоуксусная кислота не может образоваться путем карбоксилирования пировиноградной или фосфоенолпировиноградной кислоты, так как у аэробных микроорганизмов нет механизма синтеза пировиноградной кислоты непосредственно из уксусной кислоты: окисление пировиноградной кислоты до ацетил-S-КоА и CO_2 является необратимой реакцией.

Запасы щавелевоуксусной кислоты, необходимой для окисления уксусной кислоты, пополняются путем окисления янтарной и яблочной кислот, которые образуются в результате двух последовательных реакций. В первой реакции изомлимонная кислота — обычный интермедиат ЦТК — расщепля-

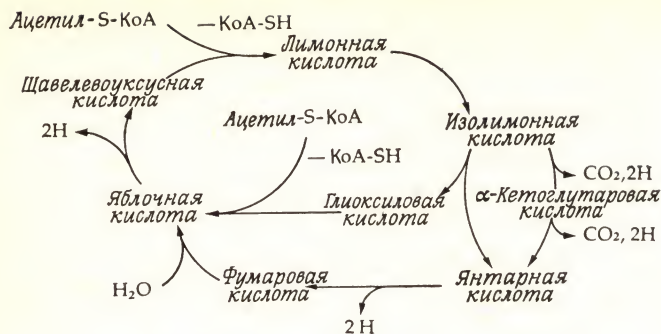
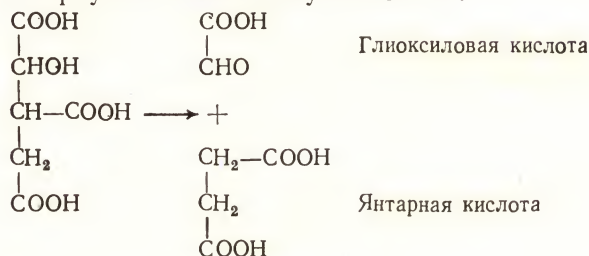
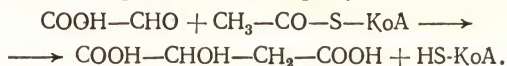


Рис. 6.9. Глиоксилатный шунт и его связь с реакциями цикла трикарбоновых кислот.

ется на янтарную и глиоксиковую кислоты:



Во второй реакции ацетил-S-CoA конденсируется с глиоксиковой кислотой, и в результате образуется яблочная кислота:



Сочетание этих двух реакций представляет собой обходный путь ряда реакций ЦТК и приводит к прямому превращению двух ацетильных остатков в щавелевоуксусную кислоту, что обеспечивает нормальное функционирование ЦТК и, кроме того, образование пировиноградной кислоты при окислении четырехуглеродных кислот. Циклический процесс, который не приводит к превращению ацетата в CO_2 , называется *глиоксилатным циклом* (рис. 6.9). Он не работает при расщеплении первичных субстратов, идущем с промежуточным образованием пировиноградной кислоты, когда щавелевоуксусная кислота может быть получена путем карбоксилирования. Два фермента обходного пути синтезируются при росте микроорганизмов на уксусной кислоте или ее прямых метаболитических предшественниках в качестве субстратов.

БИОХИМИЯ БРОЖЕНИЯ

Как указывалось выше, брожение предполагает строгое равновесие процессов окисления и восстановления; пиридиновые нуклеотиды, восстановленные на одном из этапов брожения, окисляются впоследствии на другом этапе. Этот общий принцип можно проиллюстрировать на примере двух типов бро-

А



Б



Рис. 6.10. Сравнение молочнокислого (А) и спиртового (Б) типов брожения.

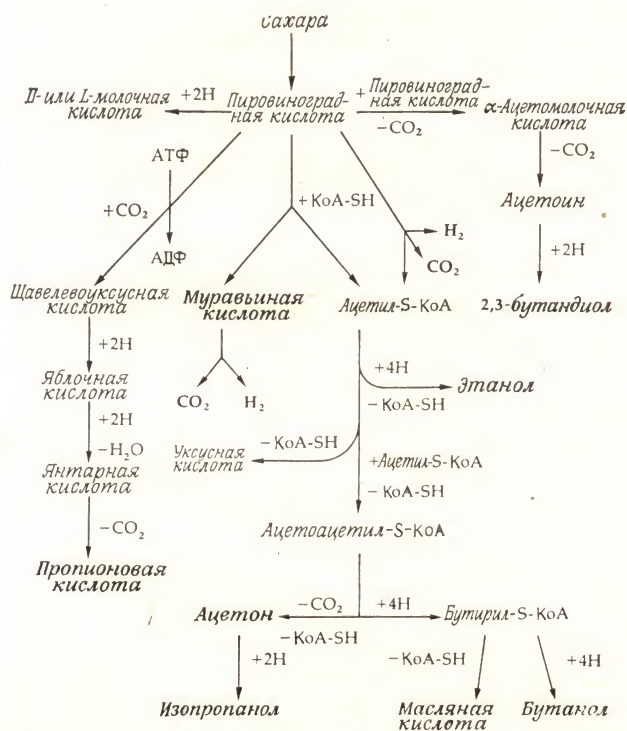


Рис. 6.11. Происхождение некоторых важнейших конечных продуктов бактериальных процессов брожения сахаров из пировиноградной кислоты. Названия конечных продуктов даны жирным шрифтом.

жения: спиртового брожения (характерного пути анаэробного метаболизма дрожжей) и гомоферментативного молочнокислого брожения (характерного для метаболизма некоторых молочнокислых бактерий в присутствии и в отсутствие воздуха). Оба эти ферментативных процесса (рис. 6.10) — небольшие модификации пути Эмбдена — Мейергофа, при которых 2 молекулы НАД⁺ восстанавливаются в дальнейших метаболических реакциях пировиноградной кислоты. В случае гомоферментативного молочнокислого брожения это окисление происходит вследствие восстановления пировиноградной кислоты в молочную. В случае спиртового брожения пировиноградная кислота вначале декарбоксилируется с образованием ацетальдегида и окисление НАД·Н происходит одновременно с восстановлением ацетальдегида в процессе образования этанола.

Путь Эмбдена — Мейергофа — наиболее широко распространенный механизм ферментативного превращения глюкозы в пировиноградную кислоту. Он используется многими группами бактерий, образующими при брожении продукты, отличные от тех, которые типичны для спиртового и гомоферментативного молочнокислого брожения. Эти отличия отражают различные пути обмена пировиноградной кислоты.

На рис. 6.11 показаны метаболические пути, ведущие от пировиноградной кислоты к различным конечным продуктам процессов бактериального брожения. В большей части таких процессов образуется несколько конечных продуктов; но ни в одном из них не синтезируются одновременно все конечные продукты, показанные на рис. 6.11.

Не все механизмы процесса брожения включают путь Эмбдена — Мейергофа. Превращения глюкозы при некоторых процессах брожения включают реакции пентозофосфатного пути, в других участвуют реакции пути Энтнера — Дудорова. Превращения субстратов при сбраживании других веществ, помимо глюкозы (например, аминокислот), включают специфические последовательности реакций.

Конечные продукты процессов бактериального брожения и метаболические пути, посредством которых они образуются, весьма специфичны для разных групп бактерий. Разнообразие процессов брожения, свойственные различным в физиологическом отношении группам бактерий, вместе с другими характерными особенностями будут рассмотрены в следующих главах.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ НАЧАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Как указывалось выше, практически не существует природных органических соединений, которые не могли бы использоваться микроорганизмами в качестве субстрата для дыха-

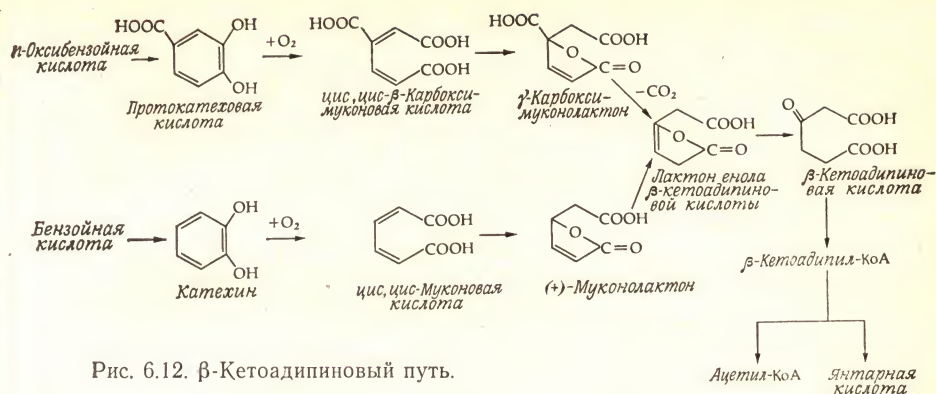


Рис. 6.12. β -Кетoadипиновый путь.

тельного метаболизма. Какой бы сложной ни была структура первичного субстрата, его использование в качестве источника энергии основано на одном и том же принципе: постепенное расщепление до образования в конце концов одного или нескольких небольших фрагментов, способных вступать в реакции ЦТК. В качестве конкретного примера таких специфических путей расщепления у микробов мы приведем реакции, участвующие в расщеплении ароматических соединений.

ОКИСЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПУТЕМ ОБРАЗОВАНИЯ β -КЕТОАДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Большинство аэробных бактерий, использующих в качестве субстрата для дыхания ароматические соединения, перерабатывают их в одном из двух путей разветвляющейся последовательности реакций, которые идут через образование β -кетoadипиновой кислоты (рис. 6.12). В ходе этих реакций шесть атомов углерода ароматического ядра первичного субстрата превращаются в шесть атомов углерода алифатической β -кетoadипиновой кислоты. Она в свою очередь расщепляется на ацетил-S-КоА и янтарную кислоту, и оба эти продукта способны непосредственно вступать в реакции ЦТК.

Ряд других структурно сходных соединений сначала превращается в интермедиаты β -кетoadипинового пути, а затем преобразуется по этому пути. Некоторые из этих соединений и те реакции β -кетoadипинового пути, в которые вступают продукты их первоначальных превращений, показаны на рис. 6.13.

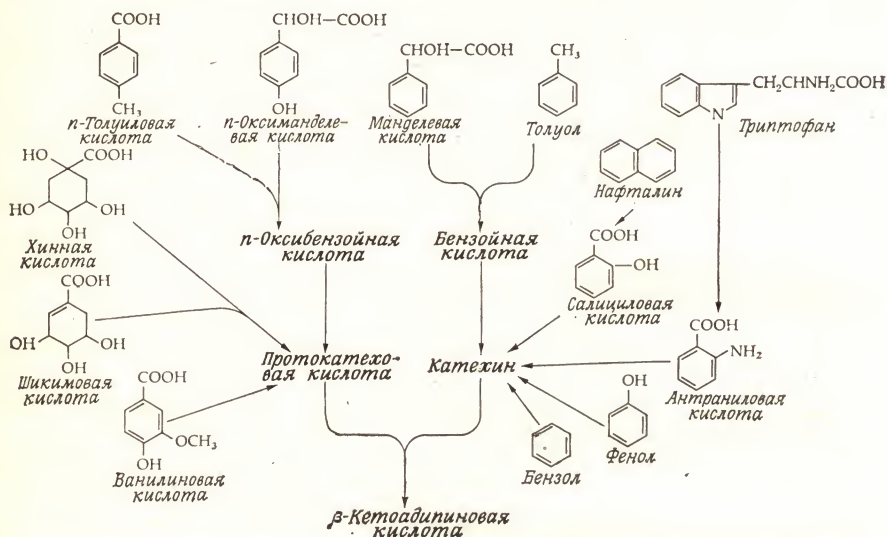
ОКИСЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Использование неорганических соединений в качестве субстратов дыхательного метаболизма встречается только у бактерий и характерно для ряда особых в физиологическом

Рис. 6.13. Некоторые соединения, которые вступают в реакции β -кетoadипинового пути; приведены их структуры

и те реакции, в которые вступают продукты их первоначальных превращений. Названия интермедиатов β -кетoadипи-

нового пути (см. рис. 6.12) даны жирным шрифтом.

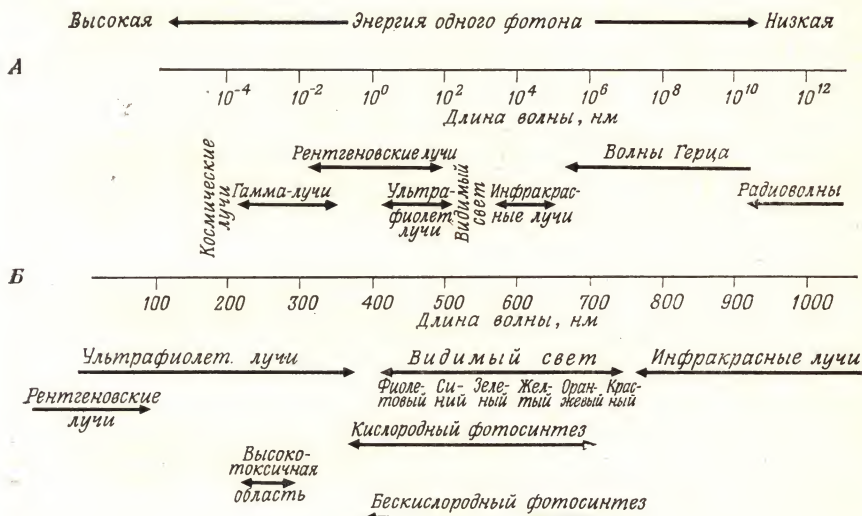


отношении групп, называемых **хемоавтотрофами**. К субстратам, которые могут служить такими источниками энергии, относятся H_2 , CO, NH_3 , NO_2^- , Fe^{2+} и восстановленные соединения серы (H_2S , S, $S_2O_3^{2-}$). При дыхательном метаболизме такого рода единственная функция субстратного окисления состоит в обеспечении синтеза АТФ при окислительном фосфорилировании и образовании восстановительного потенциала. Окисление некоторых неорганических субстратов (H_2 и восстановленных соединений серы) сопровождается переносом электронов на НАД $^+$, при этом непосредственно возникает восстановительный потенциал. Однако такой прямой перенос электронов в случае других неорганических субстратов (NO_2^- или Fe^{2+}) термодинамически невыгоден. В таких случаях НАД·Н образуется благодаря обратному транспорту электронов, когда АТФ, образованный при окислительном фосфорилировании, используется для обращения потока электронов по цепи переноса электронов, способствуя таким образом восстановлению НАД $^+$.

ФОТОСИНТЕЗ

Превращение энергии при фотосинтезе — сложный процесс, который происходит в мембранной системе, содержащей пигменты, переносчики электронов, липиды и белки. Эта система называется **фотосинтезирующим аппаратом**, и у эукариотиче-

Рис. 6.14. Спектр электромагнитных волн. А. Полный спектр отложен на экспоненциальной шкале. Б. Ультрафиолетовая, видимая и ближняя инфракрасная области сильно растянуты и отложены на линейной шкале.



ских организмов она находится в хлоропластах. В клетках трех основных групп фотосинтезирующих прокариот отмечено различное расположение фотосинтезирующего аппарата (более подробно см. гл. 11).

ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА

Энергия излучения всегда переносится дискретными дозами, которые называются *фотонами*; энергия одного фотона обратно пропорциональна длине волны соответствующего излучения (рис. 6.14). Возможное действие излучения, поглощенного веществом, зависит от энергии фотона, т. е. длины волны излучения. Инфракрасный свет с длиной волны более 1200 нм несет так мало энергии, что, будучи поглощенной, она не может вызвать химических изменений и немедленно превращается в тепло. Так называемая *ионизирующая радиация* с очень короткой длиной волны (рентгеновские лучи, α -частицы, космические лучи) несет так много энергии, что молекулы, встречающиеся на пути этого излучения, сразу же ионизируются. Излучение с длинами волн от 200 до 1200 нм (ультрафиолетовый, видимый и ближний инфракрасный свет) имеет как раз такую энергию, что оно способно вызвать химическое изменение в поглотившей его молекуле; именно этот участок электромагнитного спектра обеспечивает фотосинтез.

СПЕКТРАЛЬНЫЙ СОСТАВ СОЛНЕЧНОГО СВЕТА

Солнечное излучение сильно изменяется при прохождении через атмосферу, которая эффективно задерживает большую часть коротковолнового, богатого энергией излучения. На уровне моря примерно 75% всей энергии солнечного света содержится в свете с длиной волны от 400 до 1100 нм (видимая и ближняя инфракрасная части спектра). Полосы сильного поглощения пигментов, участвующих в улавливании света при фотосинтезе, лежат именно в этих пределах.

ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЙ АППАРАТ

Фотосинтезирующий аппарат всех организмов, способных осуществлять фотосинтез, состоит из трех основных компонентов.

1. *Система улавливания световой энергии, состоящая из поглощающих свет пигментов.* К этим пигментам относятся хлорофилл, каротиноиды и (у некоторых организмов) фикобилипротеиды. Набор поглощающих свет пигментов, составляющих систему улавливания, специфичен для каждой группы, а их общая светопоглощающая способность определяет тот диапазон длин волн света, в котором происходит фотосинтез.

2. *Реакционный центр фотосинтеза.* Энергия света, поглощенного системой улавливания, переходит в другую форму в реакционном центре фотосинтеза, который содержит молекулы хлорофилла, находящиеся в особом состоянии. Энергия света обеспечивает отрыв от молекулы хлорофилла одного электрона.

3. *Цепь переноса электронов.* Электроны, освободившиеся в реакционном центре, проходят через цепь переноса электронов, обеспечивая образование АТФ.

Три компонента фотосинтезирующего аппарата мы рассмотрим по отдельности.

Компоненты системы улавливания световой энергии, состоящей из поглощающих свет пигментов. Молекулы хлорофиллов, из которых в различных группах фотосинтезирующих организмов встречается по крайней мере семь разновидностей, построены по одному и тому же плану, приведенному на рис. 6.15. Эти соединения сходны по структуре и биосинтезу с гемами, которые служат простетическими группами в переносчиках (цитохромах) в цепи переноса электронов и во многих дыхательных ферментах. Хлорофиллы, так же как гемы, содержат центральное тетрапиррольное ядро, внутри которого расположен ион металла, соединенный с ним хелатными связями. В гемах ион металла представлен железом, в хлорофиллах — магнием. Кроме того, хлорофиллы отличаются

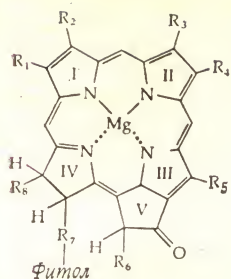


Рис. 6.15. Общий план строения молекул хлорофиллов. Тетрапиррольное ядро (кольца I—IV) имеет то же происхождение, что и геммы, но в отличие от последних содержит хелатные связи с магнием. В хлорофиллах одно или несколько пиррольных колец восстановлено; на этой диаграмме кольцо IV показано восстановленным, что характерно

для хлорофилла *a*. R_1 , R_2 и т. д. — алифатические боковые цепи, прикрепленные к тетрапиррольному ядру. При отсутствии кольца V (пентанового кольца) и спирта с длинной цепью (фитола или фарнезола) в качестве заместителя в положении R_7 — характерная особенность хлорофиллов, отличающая их от гемов.

ся от гемов еще двумя химическими свойствами: у них имеется пятое — пентановое кольцо и одна из боковых цепей тетрапиррольного ядра этерифицирована спиртом, фитолом или фарнезолом. Хлорофиллы сильно поглощают свет в двух спектральных областях: в фиолетовой области, около 400 нм, и в красной и ближней инфракрасной, около 600—800 нм. Положение пика длинноволнового поглощения заметно различается у хлорофиллов разных типов. В клетке хлорофилл тесно связан с белками, которые могут сильно изменять его спектральные свойства.

У фотосинтезирующих организмов встречается множество разновидностей каротиноидов, состоящих из длинной ненасыщенной углеводородной цепи с ответвлениями — метильными группами. Эта основная структура содержит 40 атомов углерода (рис. 6.16) и у различных представителей данного класса соединений по-разному модифицирована. Например, при замыкании концевых колец образуются шестичленные ароматические кольца, а при добавлении кислородсодержащих заместителей появляются окси-, этокси- и кетогруппы. Каротиноиды имеют одну широкую полосу поглощения света между 450 и 550 нм.

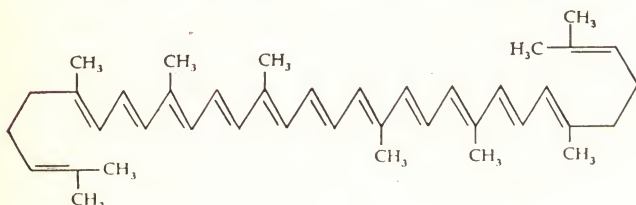
Фикобилипротеиды представляют собой водорастворимые хромопротеиды, содержащие линейные тетрапирролы. Они поглощают свет в широкой области спектра от 550 до 650 нм между основными областями поглощения хлорофилла.

Фотохимические реакционные центры и цепь переноса электронов. Энергия фотонов, поглощенных фотосинтезирующей пигментной системой, переносится в реакционные центры, где находятся в особом состоянии молекулы хлорофилла, тесно связанные с участвующими в фотосинтезе компонентами цепи переноса электронов. Первый идентифицированный акцептор в этой цепи — белок, содержащий негемовое железо, ферредоксин, который играет также важную роль в метаболизме анаэробных нефотосинтезирующих бактерий. Кроме того, в фотосинтетической цепи переноса электронов имеются

Рис. 6.16. Общий план строения молекул каротиноидов на примере каротиноида с разомкнутой цепью, не содержа-

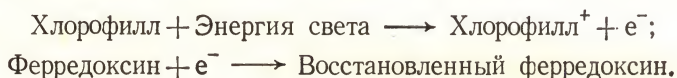
щего кислорода. Эта основная структура может быть в каротиноидах различных типов модифицирована замы-

канием одного или обоих концевых колец и введением окси-(-ОН), метокси-(-ОСН₃) или кето-(=О) групп.



компоненты, которые обнаружены в дыхательной цепи переноса электронов.

Процесс фотохимического превращения энергии начинается в тот момент, когда молекула хлорофилла в реакционном центре поглощает энергию света. Молекула хлорофилла окисляется, освобождая электрон, который акцептируется ферредоксином:



Обратное окисление восстановленного ферредоксина дает примерно столько же энергии, сколько окисление молекулярного водорода. Эта энергия передается другим переносчикам электронов фотосинтетической цепи транспорта электронов и используется таким образом для образования АТФ. Механизм, с помощью которого образуется АТФ при транспорте электронов, будет рассмотрен в следующих разделах настоящей главы.

Итак, хлорофилл играет двоякую роль в превращении энергии при фотосинтезе: он служит светопоглощающим пигментом и участвует в первичной фотохимической реакции. В то же время каротиноиды и фикобилипротеиды функционируют только как светопоглощающие пигменты, передавая энергию поглощенного ими света в реакционный центр (т.е. хлорофиллу).

У всех фотосинтезирующих организмов энергия возбужденных электронов хлорофилла может быть использована для образования АТФ в процессе *циклического фотофосфорилирования*, схема которого приведена на рис. 6.17. Электроны, отнятые у хлорофилла благодаря поглощению энергии света, проходят через фотосинтетическую цепь переноса электронов, причем последний компонент этой цепи восстанавливает хлорофилл; таким образом, электроны проходят по замкнутому пути, а их поток включается и выключается за

Рис. 6.17. Схема циклического фотофосфорилирования.

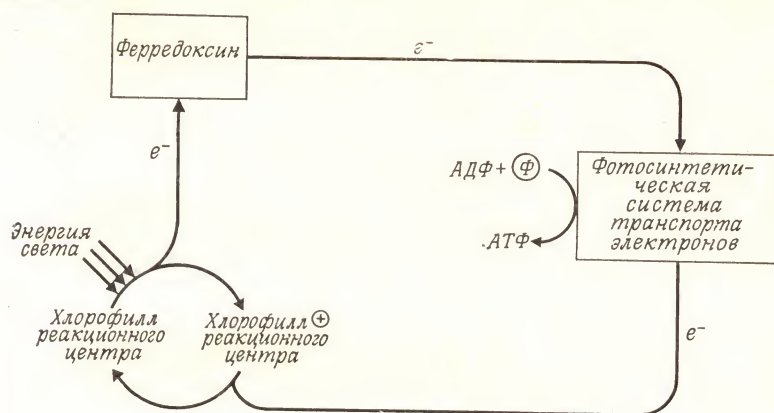
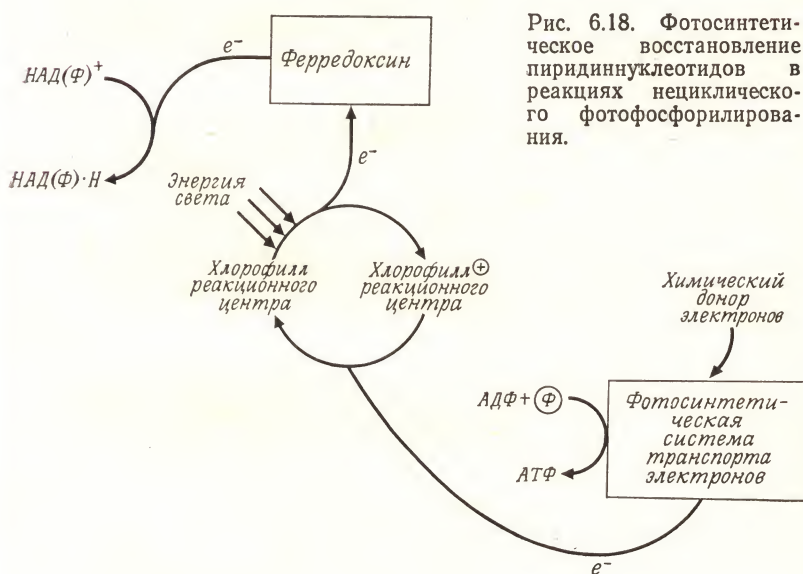


Рис. 6.18. Фотосинтетическое восстановление пиридиннуклеотидов в реакциях нециклического фотофосфорилирования.



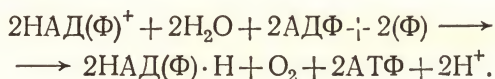
счет поглощения энергии света. Часть энергии света улавливается цепью переноса благодаря синтезу АТФ.

Другой путь использования электронов, выброшенных хлорофиллом реакционного центра под действием света, — восстановление пиридиновых нуклеотидов (рис. 6.18). При этом поток электронов становится открытым, незамкнутым, так как катион хлорофилла⁺ должен быть восстановлен электронами подходящего донора через систему переноса электронов

фотосинтезирующего аппарата. Поскольку при таком переносе электронов также может образовываться АТФ, этот процесс называется *нециклическим фотофосфорилированием*.

РАЗЛИЧИЕ МЕЖДУ КИСЛОРОДНЫМ (У РАСТЕНИЙ) И БЕСКИСЛОРОДНЫМ (У БАКТЕРИЙ) ФОТОСИНТЕЗОМ

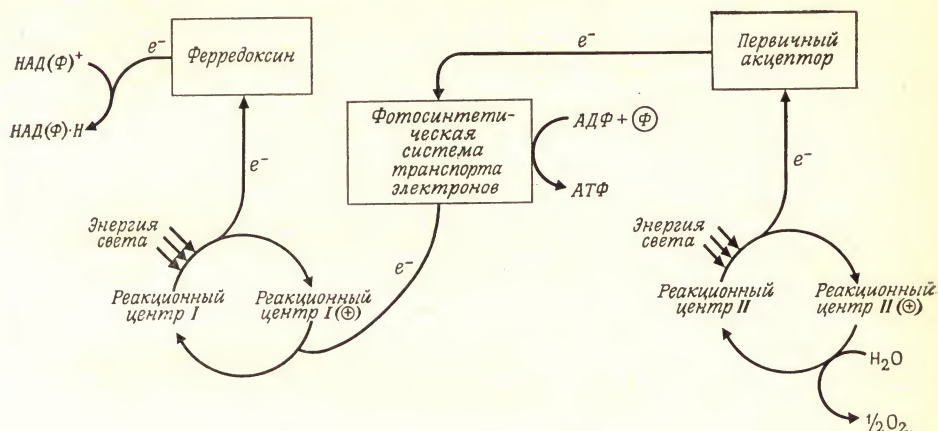
Наиболее очевидное и важное различие между кислородным и бескислородным фотосинтезом заключается в том, что в результате первого процесса образуется кислород. При кислородном фотосинтезе кислород образуется за счет окисления воды, сопряженного посредством реакции нециклического фотофосфорилирования с восстановлением НАД(Ф):



Окисление воды до O_2 не происходит спонтанно — оно требует энергии. Как же растения, водоросли и цианобактерии используют термодинамически невыгодный донор электронов? В настоящее время удалось частично ответить на этот вопрос. Было обнаружено, что фотосинтезирующий аппарат этих организмов содержит фотохимические реакционные центры двух типов. Их можно отличить по разным ответам при воздействии на них света с определенной длиной волны и ингибиторов фотосинтеза. Реакционные центры одного типа (типа I) осуществляют и циклическое, и нециклическое фотофосфорилирование. Однако поглощения света только этими реакционными центрами недостаточно для сопряжения восстановления НАДФ и окисления воды. Нециклическое фотофосфорилирование кислородного типа требует одновременного поглощения света реакционным центром другого типа (типа II), в котором и происходит *фотохимическое окисление воды*. Электроны, освободившиеся в ходе этого окисления, проходят через фотосинтетическую цепь переноса электронов и восстанавливают окисленный хлорофилл, присоединяясь к НАДФ в реакционных центрах типа I. Такое сопряжение двух световых реакций, характерное для кислородного фотосинтеза, показано на рис. 6.19.

Все имеющиеся данные свидетельствуют о том, что неспособность бактерий образовывать кислород при фотосинтезе обусловлена отсутствием реакционных центров типа II в аппарате бескислородного фотосинтеза. Фотохимические реакционные центры бескислородного фотосинтеза относятся исключительно к типу I и осуществляют циклическое фотофосфорилирование. С точки зрения фотохимии бескислородный фотосинтез — более простой процесс, чем кислородный фотосинтез.

Рис. 6.19. Сопряжение кислородного фотосинтеза, приводящего к окислению воды до O_2 двух световых реакций



Мы описали, каким образом энергия света, поглощенного пигментами фотосинтезирующего аппарата, используется для синтеза АТФ и восстановленных пиридиновых нуклеотидов. Эти реакции, сопровождающиеся превращением энергии света в химическую энергию, свойственны исключительно фотосинтезу. Вместе с тем конкретные механизмы использования этой химической энергии для биосинтетических реакций не только не являются какой-то особенностью фотосинтеза, но, строго говоря, не являются и частью процесса фотосинтеза. Последующие биосинтетические процессы включают так называемые *темновые реакции*, катализируемые ферментами в отсутствие света. Тем не менее, видимо, стоит рассмотреть сопряжение между образованием энергии при фотосинтезе и ассимиляцией CO_2 , этого важнейшего источника углерода у большинства фотосинтезирующих организмов.

Все организмы — как фотосинтезирующие, так и нефотосинтезирующие, — использующие CO_2 в качестве основного источника углерода, ассимилируют CO_2 в ходе циклической последовательности реакций (они будут обсуждаться в гл. 7), благодаря которым CO_2 превращается в клеточные компоненты (CH_2O). В итоге на это превращение расходуются две молекулы восстановленных пиридиновых нуклеотидов и три молекулы АТФ:



В реакциях нециклического фотофосфорилирования при кислородном фотосинтезе восстановленные пиридиновые нуклеотиды и АТФ образуются в эквимольных количествах. Следовательно, нециклическое фотофосфорилирование не мо-

жет обеспечить синтез всего АТФ, необходимого для ассимиляции CO_2 , и должно сопровождаться дополнительным синтезом АТФ в ходе реакций циклического фотофосфорилирования. Поэтому для ассимиляции CO_2 при кислородном фотосинтезе необходимы как циклические, так и нециклические фотохимические процессы.

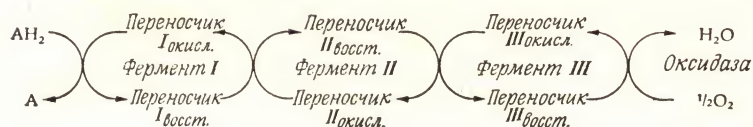
Ситуация при бескислородном фотосинтезе менее понятна, так как по крайней мере некоторые из доноров электронов, используемых в этом процессе (например, H_2), могут непосредственно участвовать в образовании восстановленных пиридиновых нуклеотидов при темновых реакциях. При этом отпадает необходимость фотохимической реакции для образования восстановительного потенциала. Следовательно, при бескислородном фотосинтезе нециклическое фосфорилирование имеет, по всей вероятности, гораздо меньшее значение, чем при кислородном. Наиболее важная функция фотохимических реакций при бескислородном фотосинтезе — образование АТФ в реакциях циклического фотофосфорилирования.

МЕХАНИЗМ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

При аэробном и анаэробном типах дыхания и при фотосинтезе АТФ образуется в результате прохождения электронов от первичного донора электронов через цепь переноса до конечного акцептора. При дыхании первичный донор электронов — окисляемый субстрат, а конечный акцептор электронов — неорганическое соединение: либо O_2 при аэробном дыхании, либо NO_3^- , SO_4^{2-} и CO_3^{2-} при анаэробном дыхании. В процессе фотосинтеза молекулы хлорофилла реакционных центров типа I служат и донорами, и акцепторами электронов для циклического фотофосфорилирования. Вместе с тем при нециклическом фосфорилировании в качестве первичного донора электронов используется H_2O , а в качестве конечного акцептора электронов — НАДФ·Н.

Хотя сложность и набор компонентов цепей переноса электронов варьируют, все подобные цепи обладают некоторыми общими свойствами: во-первых, компоненты цепи — это переносчики, способные легко вступать в обратимые реакции окисления и восстановления, и, во-вторых, АТФ образуется в результате прохождения электронов по цепи. В качестве примера на рис. 6.20 схематически изображена цепь переноса электронов, участвующая в аэробном дыхании. Электроны, отнятые от субстрата, переносятся последовательно через ряд промежуточных переносчиков, пока последний переносчик в этом ряду в восстановленном состоянии не прореагирует с кислородом. Последняя реакция катализируется оксидазой. В результате этого необратимого конечного окисления вся цепь переносчиков снова переходит в окисленное состоя-

Рис. 6.20. Схема дыхательной системы переноса электронов, связывающей дегидрирование окисляемого субстрата AH_2 с восстановлением молекулярного кислорода до воды.



ние, а кислород восстанавливается до воды. Другие цепи переноса электронов работают сходным образом и различаются только длиной цепи, первичным донором и конечным акцептором электронов.

Цепь переноса электронов может также функционировать в обратном направлении. Вместо образования АТФ за счет потока электронов от восстановленного соединения, например НАД·Н, благодаря использованию АТФ может возникнуть обратный поток электронов по цепи, который таким образом приведет к появлению восстановительного потенциала в форме НАД·Н. Такой обратный перенос электронов необходим для метаболизма некоторых хемоавтотрофов, например, таких, которые окисляют Fe^{2+} или NO_2^- , так как образование восстановительного потенциала путем непосредственного переноса электронов от неорганического субстрата на НАД⁺ термодинамически невыгодно. Возможно, часть восстановительного потенциала у фотосинтезирующих организмов также образуется при обратном переносе электронов.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЦЕПЕЙ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

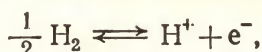
Цепи переноса электронов очень сложны. Они состоят из большого числа переносчиков электронов и различных ферментов, физически связанных с матриксом мембран, имеющим высокое содержание липидов. Такая многокомпонентная система всегда находится в мембранах. В эукариотических клетках эти мембраны локализованы в митохондриях или хлоропластах; в прокариотических клетках они обычно содержатся в самой клеточной мембране или ее впячиваниях.

Физическая структура цепей переноса электронов затрудняет их биохимический анализ. Поскольку большинство компонентов цепей нерастворимо в воде, их нелегко отделить друг от друга, сохраняя при этом активность. Имеющиеся сведения по этому вопросу получены главным образом при исследовании митохондриальной дыхательной цепи переноса электронов, которая поразительно неизменна во всех группах эукариот. Строение дыхательных цепей переноса электронов у различных бактерий гораздо более разнообразно, и компоненты этих цепей часто сильно отличаются от соответствующих компонентов митохондриальных систем.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ ЦЕПЕЙ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Если отнятие пары электронов или атомов водорода от органического субстрата сопряжено с восстановлением кислорода до воды, то происходит значительное изменение свободной энергии (ΔG°), примерно равное изменению энергии при сжигании одной молекулы газообразного водорода. Прохождение электронов через цепь переноса позволяет этой энергии выделяться порциями, и часть ее может быть превращена в богатые энергией связи АТФ. Чтобы цепь переноса электронов действовала, каждый ее компонент должен быть способен восстанавливаться под действием восстановленной формы предыдущего компонента и окисляться окисленной формой следующего компонента цепи (т. е. в цепи переноса электронов должен существовать градиент способности к окислению).

Способность какого-либо вещества отдавать или принимать электроны (т. е. окисляться или восстанавливаться) может быть количественно выражена его *электродным потенциалом* или *окислительно-восстановительным потенциалом*. Это относительно напряжение в вольтах, необходимое для отрыва от данного соединения одного электрона. Оно измеряется относительно *стандартного потенциала* водородного электрода:



которому условно приписывается значение потенциала 0,0 В в стандартных условиях (т. е. при одномолярной концентрации всех компонентов, рН 0,0). При рН 7,0, вблизи которого протекает большинство биологических реакций, и при 25 °С потенциал водородного электрода равен —0,42 В. Электродный потенциал в вольтах, измеренный при этих условиях (концентрация реагентов 1М), обозначается символом E'_0 .

Если известны значения E'_0 для двух полуреакций, то изменение свободной энергии для сопряженной реакции окисления — восстановления может быть вычислено по следующему уравнению:

$$\Delta G'_0 \rightleftharpoons nF\Delta E'_0,$$

где $\Delta G'_0$ — стандартное изменение свободной энергии при рН 7,0; n — число перенесенных электронов; F — число Фарадея (физическая константа, равная 23 000 кал/В) и $\Delta E'_0$ — разность между потенциалами двух полуреакций. Например, сжигание водорода (окисление водорода и восстановление кислорода) состоит из двух полуреакций:

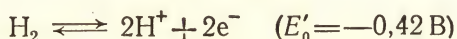
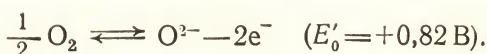
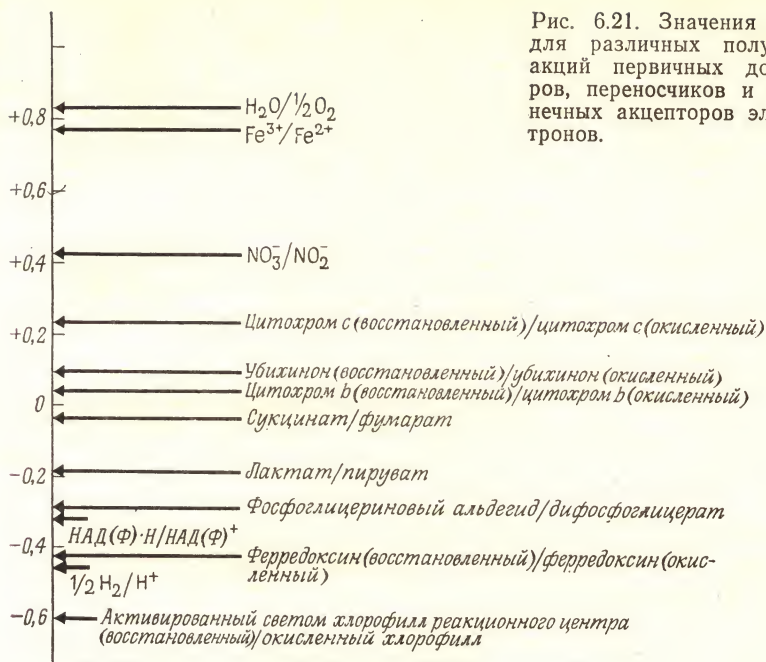


Рис. 6.21. Значения E'_0 для различных полуреакций первичных доноров, переносчиков и конечных акцепторов электронов.



Легко вычислить изменение свободной энергии:

$$-2 \cdot 23\,000 [0,82 - (-0,42)] = -57\,040 \text{ кал.}$$

Для типичного биологического окисления [например, окисления яблочной кислоты под действием кислорода до пировиноградной кислоты и CO_2 ($E'_0 = -0,33$)] аналогичные вычисления дают изменение свободной энергии, равное $-53\,000$ кал, которое незначительно отличается от окисления водорода.

Переносчики в цепи переноса электронов участвуют в последовательных реакциях с постепенно увеличивающимися значениями $\Delta E'_0$ от первичного донора электронов до конечного акцептора электронов. Доноры и акцепторы электронов, участвующие в различных реакциях образования АТФ за счет транспорта электронов, перечислены в табл. 6.3. Положение на шкале окислительно-восстановительного потенциала некоторых типичных переносчиков, первичных доноров и конечных акцепторов электронов показано на рис. 6.21.

ТАБЛИЦА 6.3
ПЕРВИЧНЫЕ ДОНОРЫ И КОНЕЧНЫЕ АКЦЕПТОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ ЗА СЧЕТ ПЕРЕНОСА
ЭЛЕКТРОНОВ

Способ образования АТФ	Первичный донор электронов	Конечный акцептор электронов
Аэробное дыхание	Органическое или неорганическое соединение	O_2
Анаэробное дыхание	Органическое соединение	NO_3^- , SO_4^{2-} или CO_3^{2-}
Циклическое фотофосфорилирование	Хлорофилл реакционного центра	Окисленный хлорофилл реакционного центра
Нециклическое фотофосфорилирование	Химическое соединение	То же

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЦЕПЕЙ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Дыхательные цепи переноса электронов изучены наиболее подробно. Цепи, участвующие в дыхательном метаболизме органических соединений, всегда содержат молекулы трех различных классов. Молекулы двух классов — это ферменты с прочно связанными простетическими группами, способными претерпевать обратимое окисление и восстановление: флавопротеиды и цитохромы. Третий класс включает небелковые переносчики с небольшим молекулярным весом — хиноны.

Флавопротеиды — белки с желтой простетической группой, которая является биосинтетическим производным витамина рибофлавина (рис. 6.22, А). Простетической группой может быть флавинмоноклеотид (ФМН) или флавинадениндинуклеотид (ФАД); оба они обладают одинаковым активным центром, способным к обратимому окислению и восстановлению (рис. 6.22, Б). Флавопротеиды представляют собой большую группу ферментов, сильно различающихся по величинам E_0' . Некоторые из них активны при первичном дегидрировании органических субстратов (например, сукцинатдегидрогеназы); другие переносят электроны от восстановленных пиридиннуклеотидов к последующим компонентам цепи переноса электронов; наконец, третьи переносят электроны непосредственно на молекулярный кислород, образуя H_2O_2 .

Основной компонент митохондриальной системы транспорта электронов — убихинон (рис. 6.23); разнообразные хиноны встречаются и в бактериальных системах транспорта электронов. Хиноны являются промежуточными переносчиками между флавопротеидами и цитохромами.

Цитохромы — это ферменты, принадлежащие к гемопро-
теидам, к которым относятся также гемоглобин и каталаза.
Все гемопро-
теиды содержат простетическую группу, пред-

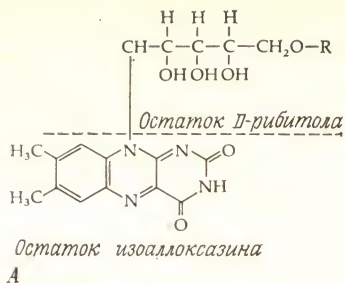


Рис. 6.22. А. Структура витамина рибофлавина (R обозначает H) и двух его производных, представляющих собой коферменты: ФМН (R обозначает PO_3H_2) и ФАД (R обозначает АДФ). Б. Обратимое окисление и восстановление кольцевой структуры ФМН и ФАД.

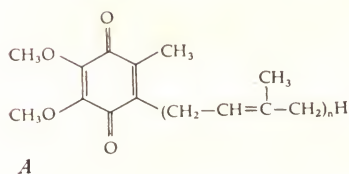
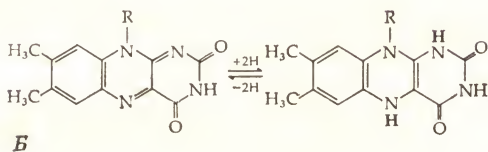
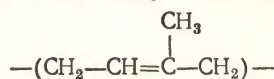


Рис. 6.23. А. Структура убикинона. Число изопреновых звеньев



в боковой цепи варьирует у различных организмов от 6 до 10. Б. Обратимое окисление и восстановление хинона.

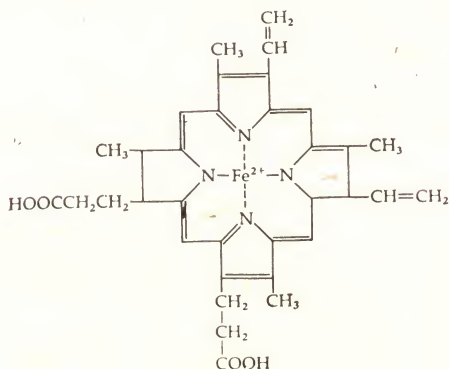
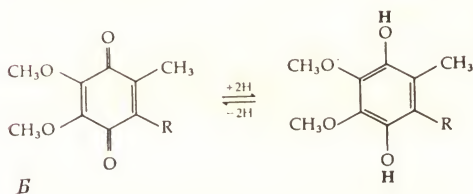


Рис. 6.24. Структура гема.

Рис. 6.25. Спектр поглощения цитохрома *c*. Сплошная линия — спектр окисленного цитохрома *c*, штриховая линия — спектр восстановленного цитохрома *c*.

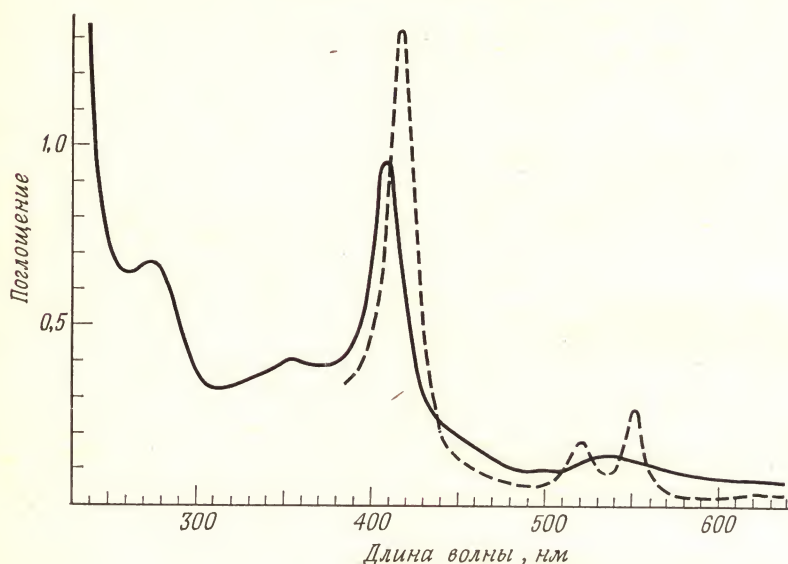
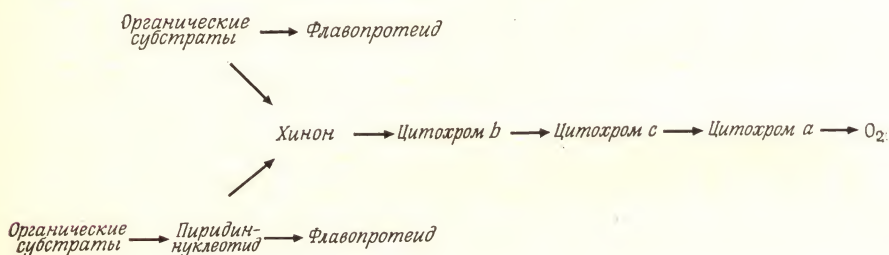
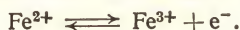


Рис. 6.26. Схема взаимодействия различных компонентов дыхательной цепи переноса электронов. Стрелками обозначен поток электронов.



ставляющую собой производное гема, циклического тетрапиррола с атомом железа, связанным хелатной связью в кольцевой системе (рис. 6.24). При переносе электронов цитохромами происходит обратимое окисление этого атома железа:



Цитохромы в восстановленном состоянии имеют характерные полосы поглощения (рис. 6.25), и их спектральные и функциональные свойства позволяют идентифицировать различные компоненты цепей переноса электронов, относящиеся к этому классу. Они обозначаются буквой после названия

Цепь переносчиков электронов при дыхании схематически изображена на рис. 6.26. Следует отметить, что у бактерий встречаются самые разнообразные варианты этой общей схемы. Например, у нитрифицирующих и серных бактерий, которые получают энергию за счет реакций со сравнительно низкими значениями E_0 , электроны попадают в цепь на уровне цитохрома *c*.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМОВ

Удивительное разнообразие бактериальных дыхательных систем переноса электронов в противоположность сходству всех подобных митохондриальных систем обнаруживается при сравнении спектра поглощения цитохромов интактных бактериальных клеток и митохондрий (табл. 6.4). Измеряя спектр поглощения восстановленной системы (анаэробная суспензия) против окисленной системы (аэробная суспензия), можно идентифицировать характерные полосы поглощения различных цитохромных компонентов. Особенно характерны так называемые α -полосы при самых больших длинах волн; β -полосы с меньшей длиной волны и так называемые полосы Сорэ¹ (названные по имени открывшего их исследователя) состоят из полос поглощения нескольких пигментов.

Как показано в табл. 6.4, цитохромы митохондрий сердечной мышцы млекопитающих и цитохромы дрожжей (организмов, находящихся на противоположных концах шкалы, отражающей биологическую сложность эукариот) обладают одинаковым спектром. У некоторых бактерий (например, у *Bacillus subtilis*) спектр цитохромов сходен со спектром цитохромов митохондрий. Однако у большинства бактерий в лучшем случае лишь немногие из основных пиков поглощения цитохромов совпадают с таковыми митохондрий.

Следует отметить, что у многих видов бактерий, перечисленных в табл. 6.4, нет пиков поглощения в области между 552 и 554 нм, характерных для цитохромов типа *c*. Отсутствие цитохромов *c* у таких организмов коррелирует с результатом эмпирического, так называемого оксидазного теста, который служит важным критерием при идентификации аэробных бактерий. Этот тест осуществляется следующим образом: бактерии помещают на кусочек фильтровальной бумаги, смоченной красителем дихлорфенолиндофенолом или *N,N*-диметил-*n*-фенилендиамином. Эти красители в восстановленном состоянии бесцветны и быстро окисляются до окрашенных форм «оксидазо-положительными» видами бактерий (содержащими цитохром *c*), но не «оксидазо-отрицательными» (у которых нет цитохрома *c*).

ТАБЛИЦА 6.4

ДЛИНЫ ВОЛН (В НМ) ОСНОВНЫХ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ЦИТОХРОМОВ
В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ПЕРЕНОСА
ЭЛЕКТРОНОВ

Системы переноса	α-Полосы			Основные β-полосы	Основные полосы Сорэ
	типы цитохромов				
	a	b	c		
Митохондриальные си- стемы					
Дрожжи	605	—	—	563 552	525 426
Сердечная мышца	605	—	—	563 552	525 426
млекопитающих					
Бактериальные системы					
<i>Bacillus subtilis</i>	604	—	—	564 552	523 422
<i>Micrococcus luteus</i>	605	—	—	562 552	523 430
<i>Micrococcus lyso- deikticus</i>	—	600	—	— 552	520 432
<i>Pseudomonas acido- vorans</i>	—	600	—	— 553	530 425
<i>Pseudomonas aerugi- nosa</i>	—	—	—	560 552	530 428
<i>Pseudomonas putida</i>	—	—	—	560 552	530 427
<i>Gluconobacter sub- oxydans</i>	—	—	—	— 554	523 428
<i>Acetobacter pasteur- ianum</i>	—	—	588	— 554	523 428
<i>Enterobacter aeroge- nes</i>	628	—	592	660 —	530 430
<i>Escherichia coli</i>	630	—	593	560 —	533 433
<i>Proteus vulgaris</i>	630	—	595	560 —	533 430
<i>Pseudomonas malto- philia</i>	628	—	597	558 —	530 430

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ АТФ ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНОВ

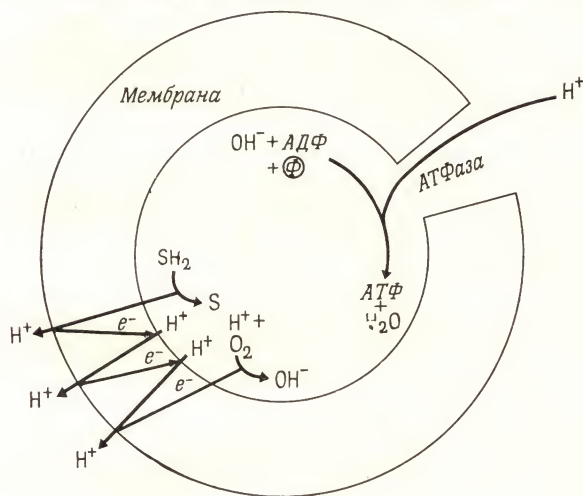
Несмотря на принципиальную биологическую важность, механизм образования АТФ при прохождении электронов через цепь переноса до сих пор вызывает некоторые разногласия. Для объяснения этого механизма были предложены две гипотезы: гипотеза химического сопряжения и химио-осмотическая гипотеза.

Согласно гипотезе химического сопряжения, предполагается, что при переходе пары электронов от одного переносчика к следующему в некоем третьем компоненте возникает богатая энергией связь, которая становится предшественницей высокоэнергетической связи АТФ. Хотя гипотеза химического сопряжения способна объяснить большую часть экспериментальных наблюдений, касающихся фосфорилирования при переносе электронов, она не в состоянии разрешить две проблемы: во-первых, гипотетический «третий компонент», содер-

Рис. 6.27. Принципиальная схема, иллюстрирующая химио-осмотическую гипотезу. Показан механизм «выбрасывания» протонов дыхательной цепью переноса электронов. Градиент рН (ΔpH) между внутренним и

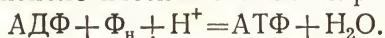
наружным относительно мембраны пространством устанавливается в результате прохождения электронов (e^-) от донора электронов (SH_2) к конечному акцептору электронов (в данном случае к O_2). Протоны

могут вернуться в клетку только в тех местах, где находится АТФаза — здесь они обеспечивают синтез АТФ. [Harold F. M., Chemiosmotic interpretation of active transport in bacteria, Ann. N. Y. Acad. of Sci., 227, 297 (1974).]



жащий богатую энергией связь, никогда не был обнаружен; во-вторых, фосфорилирование происходит только в интактных мембранных структурах, содержащих цепь переноса электронов.

В химио-осмотической гипотезе, выдвинутой Митчеллом, не предполагается существования богатых энергией третьих компонентов и требуется наличие интактной мембранной структуры. В ней постулируется, что цепь переноса электронов ориентирована поперек мембраны, так что окисление переносчиков электронов сопровождается переносом стехиометрического количества протонов в обратном направлении (рис. 6.27). Далее предполагается, что мембрана непроницаема для протонов. Поэтому при переносе электронов возникает градиент концентрации протонов (ΔpH) между внутренним и внешним относительно мембраны пространством. Протоны могут пройти обратно через мембрану только в определенных местах. В некоторых из этих мест расположены специфические белки (АТФазы), катализирующие следующую реакцию (при физиологических значениях рН):



Эта реакция поддерживается градиентом рН, существование которого и приводит к образованию АТФ.

Некоторые экспериментальные данные подтверждают химио-осмотическую гипотезу: было показано, что перенос электронов приводит к возникновению градиентов pH и что АТФазные активности связаны с мембранами¹.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Gunsalus I. C., Stanier R. Y.* (eds.), 1961, *The Bacteria*, Vol. II, New York, Academic Press.
Lehninger A. L., 1965, *Bioenergetics*, New York, Benjamin.
Lehninger A. L., 1970, *Biochemistry*, New York, Worth Publishers.
Mandelstam J., McQuillen K. (eds.), 1973, *Biochemistry of Bacterial Growth*, 2nd ed., New York, Wiley.
Sokatch J. R., 1969, *Bacterial Physiology and Metabolism*, New York, Academic Press.

¹ Кроме того, было показано, что искусственно созданный градиент pH может приводить к образованию АТФ в отсутствие переноса электронов; таким образом, химио-осмотическую гипотезу можно считать в основном доказанной. — *Прим. перев.*

Все разнообразные метаболические пути, обсуждавшиеся в гл. 6, имеют одну функцию: образование АТФ (и восстановленных пиридиннуклеотидов, если существует потребность в восстановительном потенциале) для обеспечения реакций биосинтеза. В этом смысле в основе неограниченного многообразия способов катаболического метаболизма заложен единый общий принцип. Это биохимическое единство, значение которого было впервые отмечено микробиологом Клейвером в 1926 г., становится еще более очевидным при рассмотрении способов использования АТФ в биосинтезе. Во всех клетках основными конечными продуктами биосинтеза являются белки и нуклеиновые кислоты; биохимические реакции, в ходе которых они синтезируются, очень мало различаются в разных группах прокариот и даже при сравнении прокариот и эукариот. В соответствии с этим набор основных биосинтетических реакций у всех организмов сходен. В синтезе других классов клеточных компонентов, в особенности полисахаридов и липидов, наблюдается большее разнообразие и химический состав этих соединений часто характерен для данной таксономической группы.

В настоящей главе мы сосредоточим внимание на общих для большинства или для всех организмов реакциях биосинтеза. Будут также рассмотрены некоторые более специфические биосинтетические процессы, характерные для прокариот.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСИНТЕЗА

Исследования биосинтетических процессов начались с изучения реакций, ведущих к образованию АТФ, многие из которых (например, в процессах брожения) с химической точки зрения весьма просты. Основным методом, применявшимся в этих исследованиях, было прямое изучение участвующих в превращениях ферментов, а полную последовательность реакций определяли, исходя из набора реагирующих веществ и продуктов отдельных реакций. Для изучения индуцибельных метаболических путей с успехом применялся также метод *последовательной индукции* (гл. 8). Если сравнивать клетки, растущие на индуцирующем субстрате, участвующем в реакциях исследуемого метаболического пути, с клетками, растущими на субстрате, который вступает в реакции альтернативного метаболического пути, можно сделать заключение о возможных интермедиатах индуцибельного пути. Поскольку

ферменты индуцибельного пути в отсутствие первичного индуцирующего субстрата не синтезируются, а в присутствии субстрата благодаря последовательной индукции синтезируются все ферменты этого пути, интермедиатами могут быть те вещества, которые при добавлении к клеткам, растущим в присутствии первичного индуцирующего субстрата, метаболизируются сразу после добавления, а при добавлении к клеткам, растущим на субстратах альтернативного метаболического пути, включаются в метаболизм только после некоторого лаг-периода. Например, бензойная кислота — первичный индуктор, а катехин — интермедиат β -кетoadипинового пути (гл. 6). Если к суспензии клеток *Pseudomonas putida*, растущих на бензойной кислоте, добавить катехин, то окисление катехина начинается немедленно; а если его добавить к тем же клеткам, растущим на аспарагине, то окисление начинается только после лаг-периода, который продолжается около 40 мин.

Выяснение механизмов биосинтеза началось позже, главным образом при исследовании бактерий, причем в дальнейшем было показано, что полученные выводы справедливы и в отношении других организмов. К изучению этой проблемы нельзя было даже приступать, пока не была установлена роль АТФ как вещества, осуществляющего энергетическое сопряжение между катаболизмом и биосинтезом. Кроме того, выяснение путей биосинтеза потребовало разработки новых методов, которые были хотя и полезны, но не обязательны при изучении катаболизма. Важнейшими из них являются методы, в которых используются мутанты и применяется изотопная метка.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МУТАНТОВ

Биохимические мутанты (гл. 14) стали важным инструментом в изучении биосинтеза, после того как Дж. Бидл и Э. Таутум продемонстрировали в 1940 г. возможность выделения так называемых *ауксотрофных мутантов*. Такие мутанты нуждаются в качестве факторов роста в интермедиатах биосинтеза, которые в исходных клетках могут синтезироваться *de novo*. Потребность в подобных интермедиатах возникает из-за наследуемой утраты способности синтезировать в функционально активной форме один из ферментов, катализирующих определенную реакцию данного метаболического пути. Ранние исследования биохимических мутантов привели к гипотезе, согласно которой каждый отдельный фермент кодируется определенным геном; эта гипотеза стала известна как гипотеза *один ген — один фермент*. В настоящее время известны исключения из этого правила: некоторые гены играют лишь регуляторную роль; другие кодируют РНК, которая не транслируется в белок; а некоторые ферменты состоят из

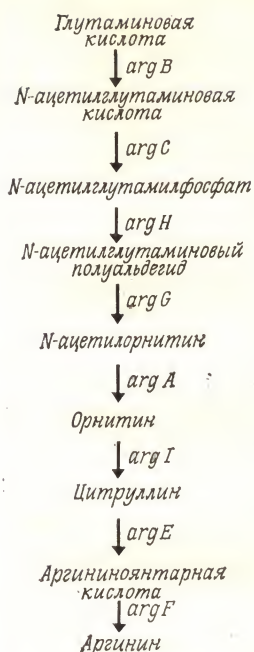
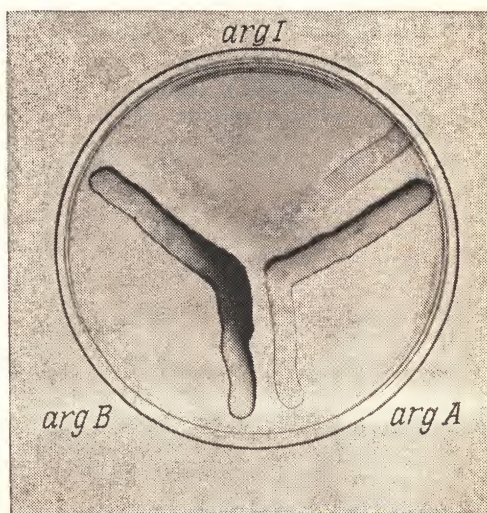


Рис. 7.1. Последовательность реакций биосинтеза аргинина у *Salmonella typhimurium*. Справа от стрелок указаны обозначения генов, кодирующих различные ферменты.

Рис. 7.2. Штаммы *Salmonella typhimurium* с мутациями в генах *argB*, *argA* и *argI* (см. рис. 7.1) посеяны рядом на среду без аргинина. Поскольку все три штамма генетически не способны синтезировать аргинин, расти на чашке поодиночке они бы не могли; однако штамм *argI* выделяет в среду орнитин, позволяющий

штаммам *argB* и *argA* расти вблизи от него. Из экспериментов такого рода можно заключить, что гены *argB* и *argA* кодируют ферменты, катализирующие более ранние этапы биосинтеза аргинина, чем *argI*. Подобно этому, штамм *argA* выделяет интермедиат, позволяющий расти штамму *argB*.



различных субъединиц, каждая из которых кодируется отдельным геном¹. Тем не менее данная гипотеза остается в целом правильным и полезным обобщением.

Для установления последовательности реакций в путях биосинтеза биохимические мутанты могут быть использованы следующим образом:

1. Определяя число различных генов, мутации в которых вызывают потребность в одном и том же факторе роста, можно выявить число различных реакций, катализируемых ферментами и участвующих в биосинтезе соответствующего фактора роста. Например, мутации восьми различных генов вызывают потребность (ауксотрофность) в аминокислоте — аргинине; следовательно, биосинтез аргинина состоит из вось-

¹ Кроме того, в последнее время обнаружено, что один и тот же ген (последовательность нуклеотидов в ДНК) может кодировать одновременно два различных белка в зависимости от порядка считывания (например, у фага ΦX174). — Прим. перев.

ми различных катализируемых ферментами реакций (рис. 7.1).

2. Генетическое блокирование пути биосинтеза обычно приводит к накоплению и выделению в среду метаболических интермедиатов, предшествующих блокированной реакции. Эти интермедиаты иногда обеспечивают рост других мутантов, у которых тот же биосинтетический путь блокирован на более раннем этапе; таким образом можно установить последовательность блокированных реакций в группе мутантных линий. Например, штаммы с мутациями в гене *arg I* выделяют орнитин (рис. 7.2), который может быть использован штаммами с блокированными более ранними реакциями, контролируемыми генами *B* и *H*. Кроме того, интермедиаты, выделяемые в среду мутантными штаммами, могут быть очищены и идентифицированы химическими методами.

3. Данные о последовательности реакций биосинтетического пути могут быть также получены путем изучения влияния предполагаемых интермедиатов этого пути на рост мутантных штаммов. Например, мутант *arg I* растет только при добавлении в среду аргинина или цитруллина, а штамм *arg A* растет при добавлении аргинина, цитруллина или орнитина. Отсюда следует, что, по всей вероятности, цитруллин и орнитин являются интермедиатами в биосинтезе аргинина.

ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОТОПНОЙ МЕТКИ

Если к растущей популяции клеток добавить интермедиат биосинтеза (например, какую-нибудь аминокислоту), то он будет препятствовать эндогенному синтезу этого интермедиата (механизм подобной регуляции будет рассмотрен в гл. 8). Следовательно, экзогенное соединение включается клеткой в цепь реакций, ведущих к образованию конечного продукта биосинтеза, предпочтительнее, чем эндогенное. Если внесенное в среду вещество помечено радиоактивным изотопом, то при химическом фракционировании меченых клеток можно исследовать распределение радиоактивности в конечных продуктах биосинтеза. Такие эксперименты показывают, например, что ^{14}C -глутаминовая кислота включается в белок не только как глутаминовая кислота, но и в виде остатков двух других аминокислот — аргинина и пролина. Это означает, что глутаминовая кислота служит предшественником при биосинтезе аргинина и пролина.

Еще один важный метод использования радиоизотопов — импульсная метка. В растущую культуру ненадолго вносят радиоактивный предшественник биосинтеза. В течение этого времени небольшое количество предшественника входит в клетку и вступает в начальные реакции различных путей биосинтеза, в которых участвует данный предшественник. Если 252 отбирать образцы клеточного материала через различные

промежутки времени после введения импульсной метки и подвергать их химическому фракционированию, то можно выявить последовательность химических превращений в тех путях биосинтеза, которые начинаются с этого вещества. Именно с помощью таких экспериментов был в основном установлен путь превращения CO_2 в органические вещества в фотосинтезирующих организмах и хемоавтотрофах. При воздействии радиоактивного CO_2 на эти организмы метка включается прежде всего в фосfogлицериновую кислоту; так было установлено, что она является продуктом первичной реакции включения CO_2 .

Радионуклидные методы применяются также для обнаружения продуктов биосинтетических реакций в бесклеточных системах, в которых скорости реакций иногда слишком малы и за реакциями трудно следить с помощью обычных химических методов. Методы с использованием радиоактивных изотопов были незаменимы в ранних исследованиях синтеза белка.

АССИМИЛЯЦИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА, АЗОТА И СЕРЫ

Многие микроорганизмы способны усваивать основные биологические элементы (т. е. углерод, азот, серу, водород и кислород) в неорганической форме: углерод в виде CO_2 ; азот в виде аммиака, нитрата или N_2 ; серу в виде сульфата и водород и кислород в виде воды. Использование CO_2 в качестве единственного источника углерода характерно для автотрофов, к которым относятся водоросли и многие фотосинтезирующие и хемоавтотрофные бактерии. Аммиак может использоваться в качестве единственного источника азота многими микроорганизмами, принадлежащими по своим пищевым потребностям к самым различным группам; некоторые из этих организмов, хотя и не все, способны к тому же использовать нитрат. Способность использовать N_2 в качестве источника азота (азотфиксация) встречается только у прокариот, и она относительно редка даже в этой группе организмов. Большинство микроорганизмов в качестве источника серы могут использовать сульфат.

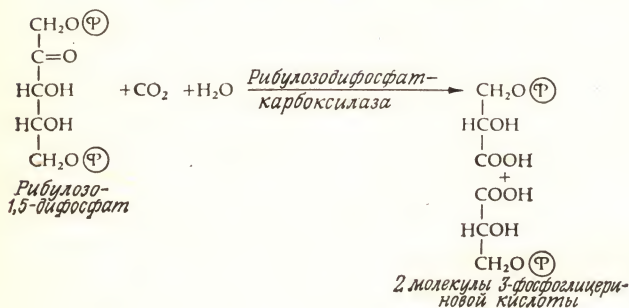
АССИМИЛЯЦИЯ CO_2

Реакции, с помощью которых хемогетеротрофы включают CO_2 в карбоксильную группу щавелевоуксусной кислоты и таким образом пополняют запасы интермедиатов цикла лимонной кислоты, были описаны в гл. 6. У таких организмов CO_2 вносит лишь незначительный вклад в пополнение запаса углерода клетки; большая часть углерода в них поступает из органических веществ. Автотрофы, для которых CO_2 служит

Рис. 7.3. Реакция фиксации CO_2 у автотрофов. Реакция катализируется рибулозодифосфаткарбоксилазой. Фосфорилированная пентоза рибу-

лозо-1,5-дифосфат акцептирует одну молекулу CO_2 , а затем расщепляется с образованием двух молекул 3-фосfogлицириновой

кислоты. Таким образом, карбоксильная группа одной из молекул 3-фосfogлицириновой кислоты происходит из CO_2 .



единственным или основным источником углерода, усваивают его с помощью реакции, катализируемой рибулозодифосфаткарбоксилазой (рис. 7.3). Первичным продуктом фиксации CO_2 является 3-фосfogлицириновая кислота, из которой синтезируются все остальные органические молекулы клетки. Однако усвоение CO_2 зависит от поступления в реакцию фиксации второго субстрата — рибулозодифосфата. Следовательно, большая часть фосfogлицириновой кислоты должна использоваться для регенерации рибулозодифосфата. Таким образом, процесс усвоения CO_2 носит циклический характер, причем каждый оборот цикла приводит к фиксации одной молекулы CO_2 . Различные интермедиаты цикла выходят из него и вступают в другие реакции биосинтеза.

Этот механизм усвоения CO_2 был впервые открыт у зеленых водорослей М. Кальвином, А. Бенсоном и Дж. Басхемом и иногда называется циклом Кальвина. Дальнейшие исследования показали, что он универсален для автотрофов.

Цикл Кальвина — сложный путь, включающий некоторые реакции гликолиза и пентозофосфатного пути (гл. 6). Всего две реакции участвуют только в этом цикле: сама реакция фиксации CO_2 и реакция, в результате которой образуется акцептор CO_2 (рибулозо-1,5-дифосфат) из его непосредственного предшественника рибулозо-5-фосфата.

Цикл Кальвина легче анализировать, если разделить его на три фазы: фиксация CO_2 , восстановление фиксированного CO_2 и регенерация акцептора CO_2 (рис. 7.4).

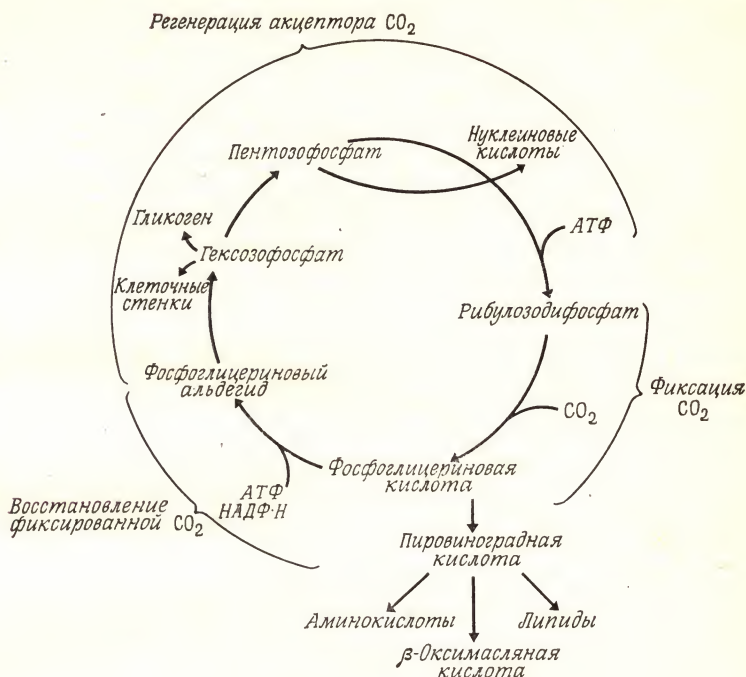
ФИКСАЦИЯ CO_2

Как говорилось выше, фиксация CO_2 происходит в результате одной реакции, при которой образуются две молекулы фосfogлицириновой кислоты (рис. 7.3).

Рис. 7.4. Схема, иллюстрирующая циклический характер цикла Кальви-

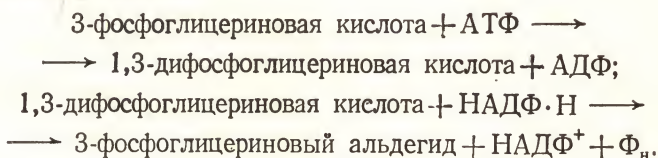
на. Показаны источники основных компонентов клетки и три фазы цик-

ла: фиксация CO_2 , ее восстановление и регенерация акцептора CO_2 .



ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФИКСИРОВАННОЙ CO_2

Для того чтобы фиксированная в виде карбоксильной группы фосфоглицериновой кислоты CO_2 могла быть использована в биосинтезе, она должна быть сначала восстановлена до уровня окисления, характерного для основных компонентов клетки. Это восстановление происходит в два этапа в ходе реакций, участвующих в гликолизе (гл. 6), но протекающих в обратном направлении.



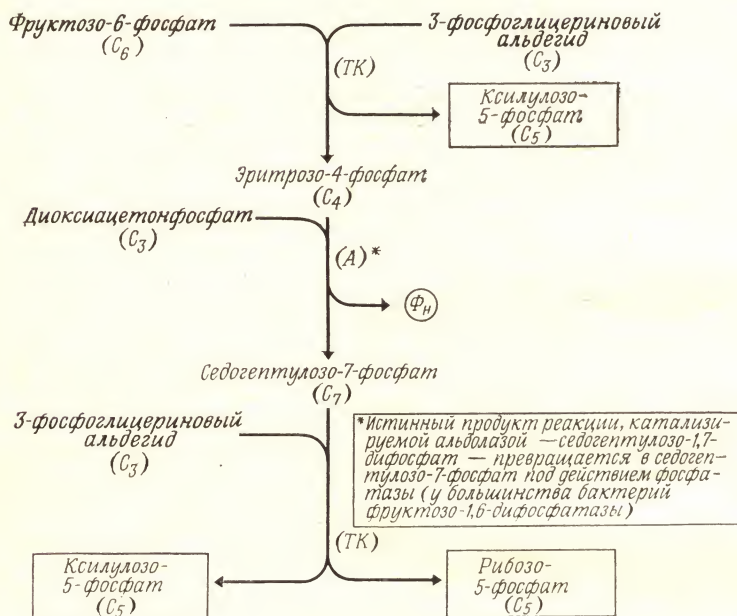
РЕГЕНЕРАЦИЯ АКЦЕПТОРА CO_2

3-фосфоглицериновый альдегид превращается во фруктозо-1,6-дифосфат под действием двух ферментов гликолиза (гл. 6). Последующие реакции уже не участвуют в гликоли-

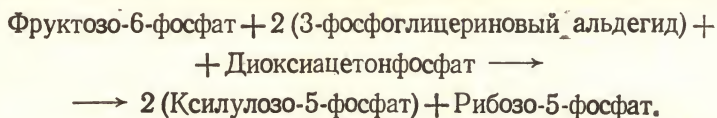
Рис. 7.5. Взаимопревращения сахарофосфатов под действием транскетолазы (ТК) и альдолазы (А), которые приво-

дят к образованию трех молей пентозофосфатов из одного моля фруктозо-6-фосфата и трех молей триозофосфатов.

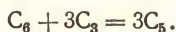
Вступающие в реакции вещества обозначены жирным шрифтом, продукты обведены рамками.



тическом пути. После отщепления фосфатной группы и образования фруктозо-6-фосфата следует ряд реакций, катализируемых ферментами пентозофосфатного пути — транскетолазой и трансальдолазой, а также гликолитическим ферментом альдолазой; при этом 1 моль фруктозо-6-фосфата и 3 моля триозофосфатов превращаются в 3 моля пентозофосфатов.

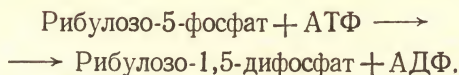


Схематически это превращение можно записать следующим образом:



Эти реакции показаны на рис. 7.5. Продукты рассматриваемых последовательных реакций — пентозофосфаты ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат — превращаются в рибулозо-5-фосфат под действием эпимеразы и изомеразы соответственно. Затем рибулозо-5-фосфат фосфорилируется вторым ферментом, участвующим только в цикле Кальвина, — фосфо-

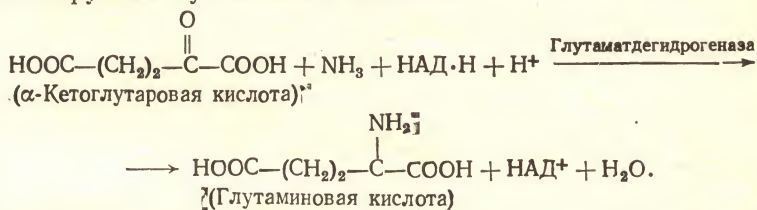
рибулокиназой, и таким образом регенерируется акцептор CO_2 .



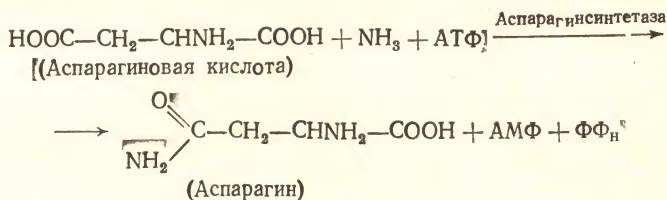
На каждую фиксированную молекулу CO_2 должна быть регенерирована одна молекула рибулозо-1,5-дифосфата. Для самой реакции фиксации CO_2 АТФ не нужен, но для регенерации рибулозо-1,5-дифосфата требуется 3 молекулы АТФ: 2 молекулы для фосфорилирования 3-фосфоглицериновой кислоты и одна молекула для фосфорилирования рибулозо-5-фосфата. Кроме того, для восстановления двух молекул 1,3-дифосфоглицериновой кислоты на восстановительной стадии цикла необходимы 2 молекулы НАДФ·Н. Следовательно, для фиксации одной молекулы CO_2 всего необходимо израсходовать 3 молекулы АТФ и 2 молекулы НАДФ·Н (рис. 7.4).

АССИМИЛЯЦИЯ АММИАКА

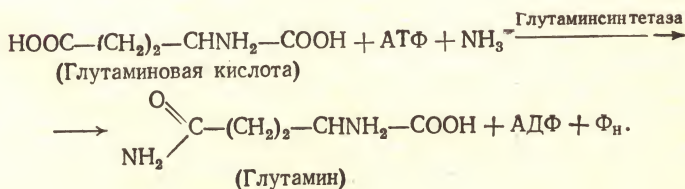
Атом азота аммиака, имеющий валентность —3, находится на том же уровне окисления, что и атомы азота в органических веществах клетки. Следовательно, усвоение аммиака не требует окисления или восстановления. Существует 3 реакции ассимиляции NH_3 . Одна из них приводит к образованию аминокруппы глутаминовой кислоты:



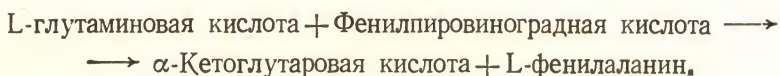
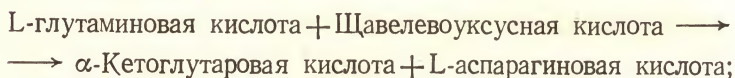
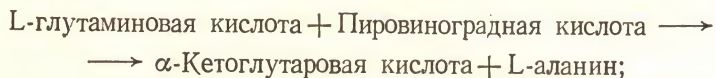
Две другие ведут к появлению амидогрупп [аспарагина и глутамина:



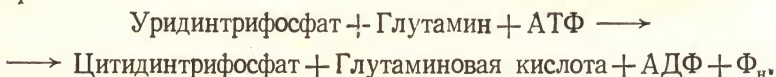
и



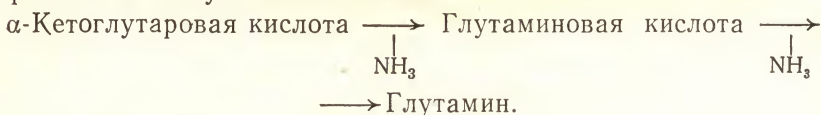
Все три продукта ассимиляции NH_3 (глутаминовая кислота, аспарагин и глутамин) — непосредственные предшественники белков, а роль аспарагина только в этом и заключается. Вместе с тем глутаминовая кислота и глутамин служат, кроме того, источниками аминок- и амидогрупп, благодаря которым образуются все другие азотсодержащие предшественники клеточных макромолекул. Например, аминокислоты аланин, аспарагиновая кислота и фенилаланин образуются путем переаминирования между глутаминовой кислотой и метаболитами, не содержащими азота, а именно:



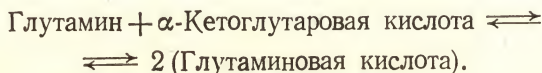
Амидогруппа глутамина используется как источник аминокгрупп цитидинтрифосфата, карбамоилфосфата, НАД и гуанозинтрифосфата, а также ряда других соединений, например:



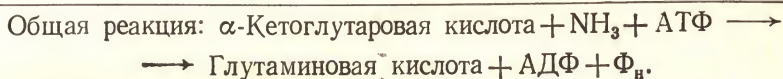
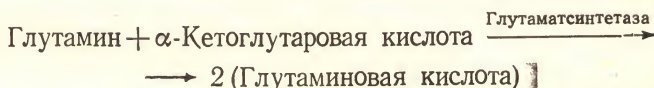
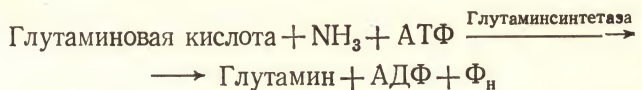
Пути синтеза глутаминовой кислоты и глутамина зависят от концентрации доступного NH_3 в клетке. При высокой концентрации NH_3 синтез этих соединений происходит в результате двух последовательных реакций, катализируемых дегидрогеназой и глутаминсинтетазой:



Однако субстратное сродство глутаматдегидрогеназы к NH_3 довольно низкое; поэтому при небольших концентрациях NH_3 фермент перестает эффективно работать и этот путь биосинтеза становится недействительным. Тогда индуцируется новый фермент — глутаматсинтетаза, который иногда называют ГОГАТ (сокращение другого названия фермента глутаминоксиглутарат — аминотрансфераза); он катализирует реакцию



При этих условиях реакция, катализируемая глутаминсинтетазой, становится основным способом усвоения NH_3 , т. е. вместо того, чтобы синтезироваться под действием глутаматдегидрогеназы, глутаминовая кислота синтезируется в результате следующей цепи реакций:

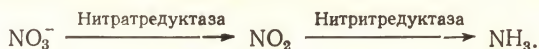


АССИМИЛЯЦИЯ НИТРАТА

Ион нитрата (NO_3^-) используется в качестве источника азота многими микроорганизмами. Валентность атома азота в NO_3^- равна +5; поэтому его ассимиляция включает восстановление до валентности —3 путем предварительного превращения в аммиак.

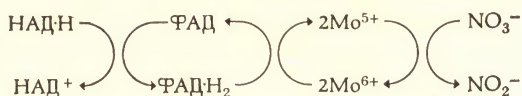
Как уже обсуждалось в гл. 6, нитрат восстанавливается также некоторыми микроорганизмами, использующими его в качестве конечного акцептора электронов при анаэробном дыхании. Некоторые микроорганизмы, использующие нитрат в качестве источника азота, не могут использовать его для анаэробного дыхания, так как эти два процесса, в ходе которых нитрат восстанавливается, катализируются различными ферментными системами.

Процесс ассимиляционного восстановления нитрата осуществляется двумя ферментными комплексами, которые называются нитратредуктазой и нитритредуктазой:



Для функционирования нитратредуктаз бактерий и растений, участвующих в ассимиляции нитрата, в качестве источника электронов необходим НАД·Н; фермент из грибов использует предпочтительно НАДФ·Н. Однако в других отношениях нитратредуктазы всех организмов сходны. Они представляют собой высокомолекулярные комплексы из двух различных белков. Первый из них — ФАД-зависимый белок — акцептирует электроны восстановленных пиридиннуклеотидов и переносит их на второй белок, содержащий молибден (Мо); при этом Mo^{6+} восстанавливается до Mo^{5+} . Второй белок осуществляет восстановление нитрата до нитрита. Путь переноса

электронов может быть схематически представлен следующим образом:



Нитритредуктаза бактерий, участвующая в ассимиляции нитрата, также использует в качестве донора электронов НАД·Н и требует для своей активности ФАД. У водорослей и высших растений вместо ФАД функционирует ферредоксин. Восстановление нитрата до аммиака заключается в присоединении шести электронов, и раньше предполагали, что восстановление происходит путем нескольких двухэлектронных переносов с образованием соответствующих интермедиатов, в частности гидроксилamina. Однако имеющиеся в настоящее время данные указывают, что нитрит непосредственно восстанавливается до NH_3 и никакие свободные интермедиаты не образуются.

Таким образом, восстановление нитрата до аммиака — довольно сложный процесс, в котором участвуют несколько белков. Этим объясняется тот факт, что многие микроорганизмы, хорошо растущие в присутствии аммиака, не могут использовать нитрат в качестве альтернативного неорганического источника азота. Следует отметить, что важную роль в ассимиляционном восстановлении азота играет молибден. Это предполагали еще задолго до того, как стал известен биохимический механизм восстановления нитрата, так как было обнаружено, что молибден необходим для роста микробов в присутствии нитрата, но не в присутствии аммиака. Этот элемент играет также важную роль в фиксации N_2 и является необходимым для всех организмов, использующих для своего роста окисленные формы азота: нитрат или N_2 .

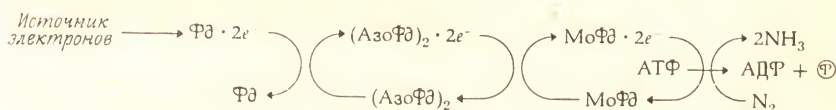
АССИМИЛЯЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

Газообразный азот (N_2) с валентностью, равной 0, до того как он будет включен в азотсодержащие вещества клетки, также должен быть восстановлен до аммиака. Этот процесс, называемый азотфиксацией, встречается только у прокариот.

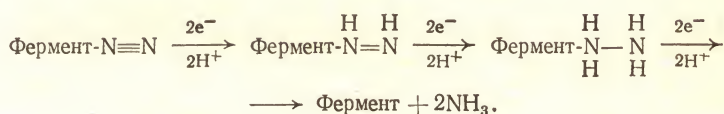
Хотя способность некоторых бактерий, как свободноживущих, так и симбиотических, фиксировать N_2 была обнаружена около 100 лет назад, попытки расшифровки биохимического механизма фиксации N_2 в течение длительного времени кончались неудачами из-за трудностей в приготовлении активных бесклеточных экстрактов. Эти трудности удалось преодолеть Мортенсону и его коллегам, которые впервые описали характерные особенности, свойственные, как теперь

известно, всем азотфиксирующим ферментативным системам. Эти системы: 1) крайне чувствительны к необратимой инактивации низкими концентрациями O_2 и 2) нуждаются в АТФ, который благодаря работе какой-либо АТФ-синтезирующей системы должен поступать постепенно, так как в присутствии АТФ в высоких концентрациях фермент ингибируется.

Ферментная система, ответственная за фиксацию N_2 , называется нитрогеназой. Она нуждается в источнике электронов. Независимо от их непосредственного источника они должны подаваться в нитрогеназную систему через восстановитель с низким потенциалом, содержащий негеминное железо, — переносчик электронов ферредоксин (Фд):



В цепи переноса электронов, состоящей из ферредоксина (Фд), азоферредоксина (АзоФд) и молибдоферредоксина (МоФд), за один раз переносится только два электрона (для последнего переноса необходимо израсходовать 1 молекулу АТФ). Но для восстановления N_2 до аммиака необходимы шесть электронов, поэтому реакция должна состоять из трех последовательных двухэлектронных стадий. Характерно, что в реакционной смеси никогда не находили частично восстановленных интермедиатов. По всей вероятности, интермедиаты остаются связанными с ферментом, и восстановление идет через следующие промежуточные стадии:



Субстратная специфичность нитрогеназы относительно низка: она может восстанавливать целый ряд соединений, например N_3^- , N_2O , HCN , CH_3NC , CH_2CHCN и C_2H_2 . Некоторые из восстановительных реакций заключаются в переносе всего двух, а не шести электронов, необходимых для восстановления N_2 . Согласно предполагаемому механизму, такие двухэлектронные реакции восстановления должны протекать вдвое быстрее, чем восстановление N_2 , и в большинстве случаев так и происходит.

261 Исследованиям биологической азотфиксации в целых клетках и в экстрактах очень помогли опыты, в которых в

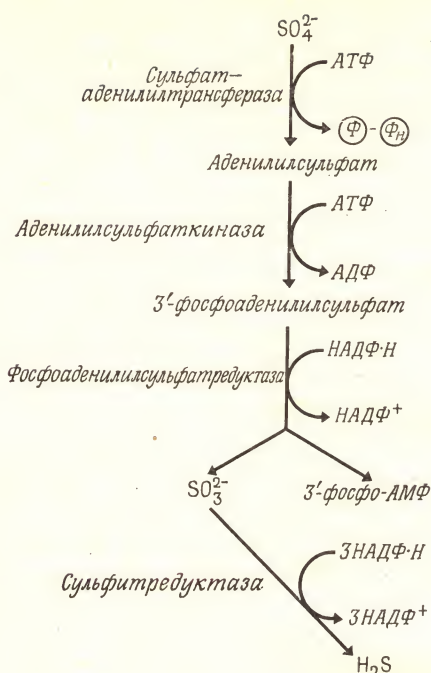
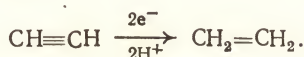


Рис. 7.6. Ассимиляционное восстановление сульфата до H_2S для использования в биосинтетических реакциях.

качестве субстрата использовали ацетилен; последний восстанавливался до этилена:



Количество продукта реакции легко измерить с помощью газовой хроматографии, а сама реакция весьма специфична, так как никакая другая ферментная система не может влиять на это восстановление.

АССИМИЛЯЦИЯ СУЛЬФАТА

Подавляющее большинство микроорганизмов способно удовлетворять свою потребность в сере за счет сульфата. Сульфат, валентность серы в котором равна +6, прежде чем включиться в состав органических соединений клетки, восстанавливается до сульфида (валентность —2). С химической точки зрения это эквивалентно восстановлению сульфата сульфатредуцирующими бактериями, которые используют сульфат в качестве конечного акцептора электронов при анаэробном дыхании, как это обсуждалось в гл. 6. Однако ферментативные механизмы этих процессов различаются: восстановление сульфата для использования в качестве источника серы называется ассимиляционным восстановлением сульфата.

та (по аналогии с ассимиляционным восстановлением нитрата) в отличие от диссимиляционного восстановления сульфата, когда сульфат используется в качестве конечного акцептора электронов.

Путь ассимиляционного восстановления сульфата до H_2S в общих чертах приведен на рис. 7.6. Начальное двухэлектронное восстановление сульфата происходит только после того, как он превращается в активную форму — аденилилсульфат — в результате трех ферментативных реакций, требующих расщепления трех богатых энергией фосфатных связей. Шестиэлектронное восстановление полученного соединения катализируется очень большим и сложным флавин- и металл-содержащим белком сульфитредуктазой. Сульфитредуктаза *E. coli* имеет мол. вес 750 000 и содержит 4 молекулы ФАД, 4 молекулы ФМН и 12 железосодержащих простетических групп.

СТРАТЕГИЯ БИОСИНТЕЗА

Большую часть органического вещества клетки составляют макромолекулы, принадлежащие к четырем классам: нуклеиновым кислотам, белкам, полисахаридам и сложным липидам. Эти макромолекулы представляют собой полимеры низкомолекулярных органических предшественников. Макромолекулы разделяются на классы в зависимости от того, какие предшественники полимеризуются при их образовании: в случае нуклеиновых кислот это нуклеотиды, в случае белков — аминокислоты и в случае полисахаридов — простые сахара (моносахариды). Сложные липиды более разнообразны и гетерогенны по своему составу: среди их предшественников встречаются жирные кислоты, многоатомные спирты, простые сахара, амины и аминокислоты. Как показано в табл. 7.1,

ТАБЛИЦА 7.1

КЛАССЫ МАКРОМОЛЕКУЛ И СОСТАВЛЯЮЩИХ ИХ БЛОКОВ

Макромолекула	Химическая природа блоков	Число разновидностей блоков
Нуклеиновые кислоты		
РНК	Рибонуклеотиды	4
ДНК	Дезоксирибонуклеотиды	4
Белки	Аминокислоты	20
Полисахариды	Моносахариды	~15 ¹⁾
Сложные липиды	Различные	~20 ¹⁾

¹⁾ Число различных строительных блоков в каждом отдельном представителе этих макромолекул обычно значительно меньше.

для синтеза макромолекул четырех основных классов необходимо примерно 70 различных предшественников.

Помимо предшественников макромолекул клетка должна синтезировать ряд соединений, играющих каталитическую роль. К ним относится примерно 20 коферментов и переносчиков электронов. Всего для образования новой клетки необходимо примерно 150 различных малых молекул. Эти малые молекулы в свою очередь синтезируются из еще меньшего числа основных промежуточных метаболитов, которые образуются в ходе катаболизма у гетеротрофов (гл. 6) или при ассимиляции CO_2 у автотрофов. К важнейшим из этих интермедиатов относятся фосфорные эфиры сахаров, пировиноградная, уксусная, щавелевоуксусная, янтарная и α -кетоглутаровая кислоты.

В последующих разделах мы проследим пути биосинтеза небольших молекул из основных промежуточных метаболитов. В заключительной части настоящей главы мы рассмотрим реакции, в которых они полимеризуются в макромолекулы.

СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ

Предшественники нуклеиновых кислот — пурин- и пиримидиннуклеозидтрифосфаты — все обладают в общем сходным строением. Пуриновое или пиримидиновое основание присоединяется к пентозе через атом азота с образованием нуклеозида. Фосфатные группы связываются нуклеозидом в 5'-положении (чтобы различать углеродные атомы основания и пентозного остатка в нуклеозиде, атомы углерода пентозы обозначаются штрихом после номера). Это соединение называется нуклеотидом. Общее строение нуклеозидтрифосфатов показано на рис. 7.7. Названия и структуры отдельных нуклеозидов приведены на рис. 7.8. Нуклеотиды обозначаются буквами А, Г, У, Ц или Т, которые указывают на содержащееся в них пуриновое или пиримидиновое основание; буквы МФ, ДФ или ТФ обозначают моно-, ди- или трифосфаты соответственно. Дезоксинуклеотиды обозначаются строчной буквой д (например, ЦДФ обозначает цитидиндифосфат, а дГТФ — 2-дезоксигуанозинтрифосфат). Два пуриновых (дАТФ и дГТФ) и два пиримидиновых (дЦТФ и дТТФ) нуклеозидтрифосфата, содержащие дезоксирибозу, являются специфическими предшественниками ДНК; два пуриновых (АТФ и ГТФ) и два пиримидиновых (ЦТФ и УТФ) нуклеозидтрифосфата, содержащие рибозу, — специфические предшественники РНК. Некоторые из этих нуклеозидтрифосфатов служат также активаторами различных соединений (гл. 6, табл. 6.1) и играют, таким образом, две роли.

Дезоксирибонуклеотиды образуются путем восстановления соответствующих рибонуклеотидов. Поэтому сначала мы рас-

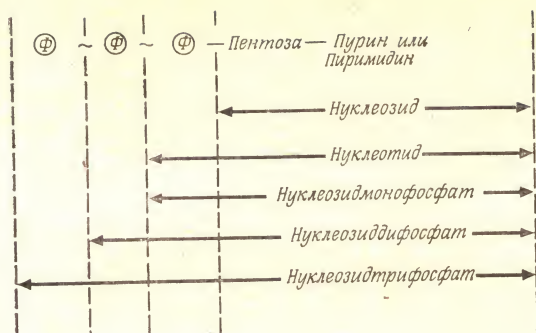


Рис. 7.7. Общая структура нуклеозидтрифосфатов. ~ богатые энергией (ангидридные) связи фосфата; — бедная энергией (эфирная) связь фосфата.

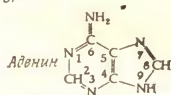
Рис. 7.8. Названия и структура нуклеозидтрифосфатов. Пурины в по-

ложении 9 и пиримидины в положении 3 присоединены к атому 1 пен-

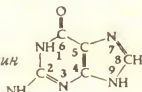
тозы с образованием нуклеозидов.

ОСНОВАНИЕ
Название Структура оснований

Пурины



Гуанин



Пиримидины

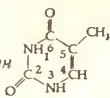
Урацил



Цитозин

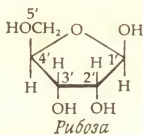


Тимин



РИБОНУКЛЕОЗИДЫ
Структура пентозы Название

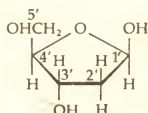
Аденозин



Гуанозин

2'-ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДЫ
Структура пентозы Название

2'-дезоксаденозин



2'-дезоксигуанозин

2'-дезоксирибоза

Уридин

Цитидин

2'-дезоксцитидин

2'-дезокситимидин

смотрим пути синтеза рибонуклеотидов, а затем обсудим превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды.

СИНТЕЗ РИБОНУКЛЕОТИДОВ

Рибозофосфатный остаток всех рибонуклеотидов происходит из общего предшественника, 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ), который в свою очередь синтезируется из рибозо-5-фосфата (интермедиата пентозофосфатного пути) и АТФ:

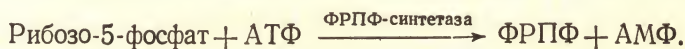


Рис. 7.10. Биосинтез пуриновых рибонуклеотидов АМФ и ГМФ. FN_4 —

тетрагидрофолиевая кислота.

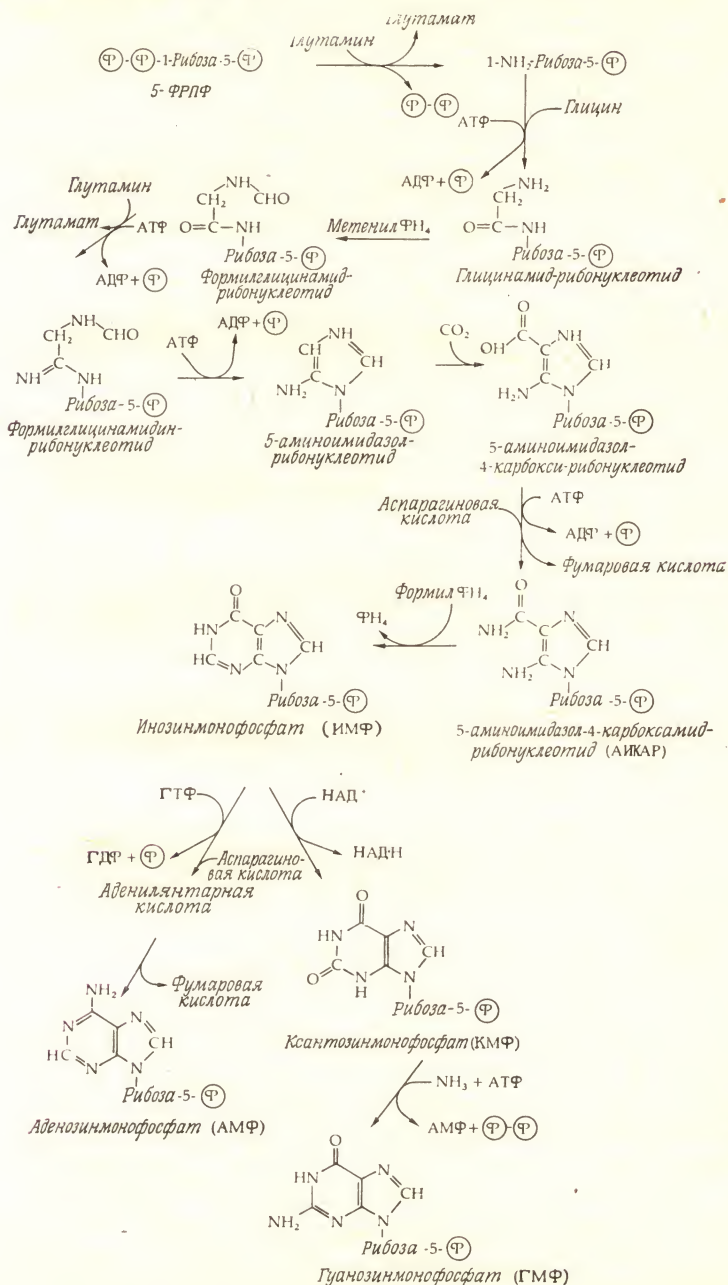


Рис. 7.11. Взаимопревращения ГМФ и АМФ и участие АМФ в био-

синтезе аминокислоты гистидина (см. рис. 7.10 и 7.26); КМФ — ксанто-

зинмонофосфат, FH_4 — тетрагидрофолиевая кислота.

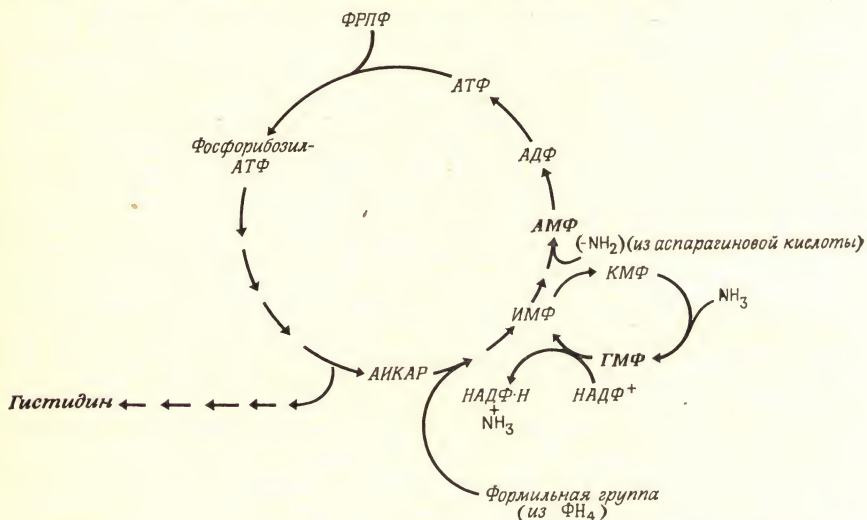


Рис. 7.12. Биосинтез пи-
римидинового рибону-
клеотида УМФ.

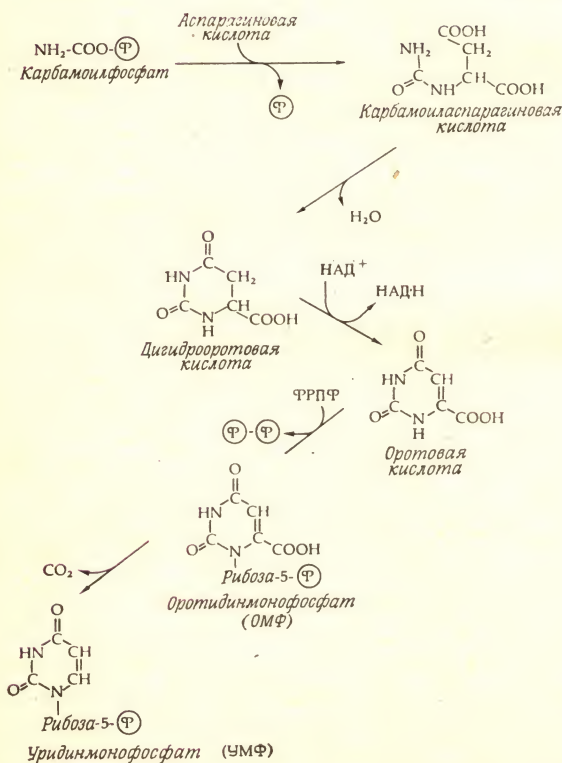


Рис. 7.13. Биосинтез рибонуклеозидтрифосфатов из УМФ, АМФ и ГМФ. Реакции *a*, *b* и *в* катализируются тремя

специфическими киназами; реакции *г* катализируются неспецифической нуклеозиддифосфаткиназой. Буквой *д* обо-

значен ряд обсуждавшихся в гл. 6 реакций, при которых образуется АТФ.

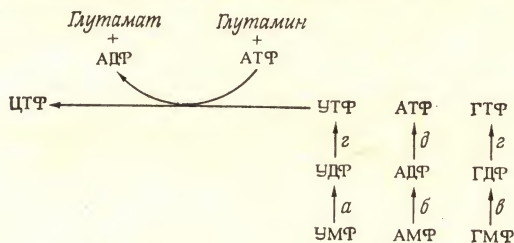
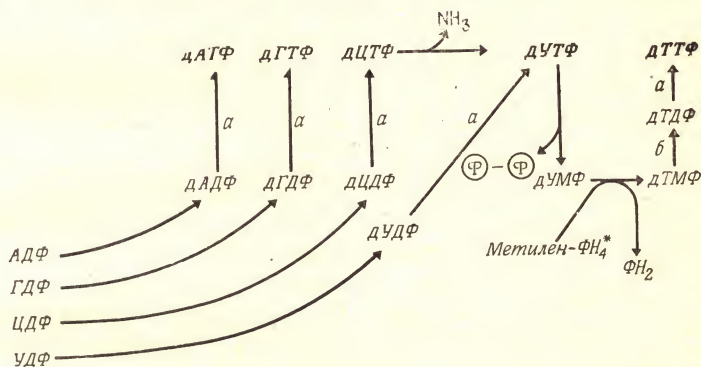


Рис. 7.14. Биосинтез дезоксирибонуклеозидтрифосфатов у *E. coli*.

Реакции *a* катализируются нуклеозиддифосфаткиназой, реакция *б*

катализируется специфической ТМФ-киназой.



* FH_4 и FH_2 — тетра- и дигидрофолиевая кислоты соответственно

зидмонофосфата, АМФ и ГМФ, и пиримидинрибонуклеозидмонофосфат УМФ являются предшественниками четырех основных рибонуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ). Пути превращений монофосфатов в трифосфаты показаны на рис. 7.13.

СИНТЕЗ 2'-ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата — предшественники ДНК (дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) — синтезируются из рибонуклеотидов (рис. 7.14). Три из них (дАТФ, дГТФ и дЦТФ) образуются при восстановлении соответствующих рибонуклеотидов одним ферментным комплексом, находящимся под строгим контролем. У большинства бактерий, в том числе у *E. coli*, это восстановление происходит на уровне нуклеозиддифосфатов; однако у молочнокислых бактерий оно

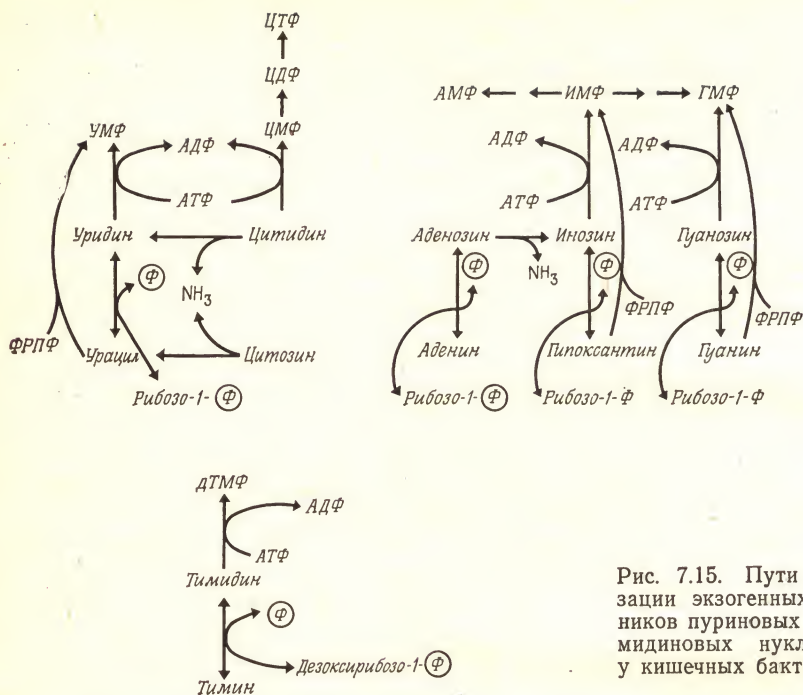


Рис. 7.15. Пути утилизации экзогенных источников пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов у кишечных бактерий.

происходит на уровне нуклеозидтрифосфатов. В первом случае продукты реакции — дезоксинуклеозиддифосфаты (дАДФ, дГДФ и дЦДФ) — превращаются в трифосфаты под действием одного фермента, нуклеозиддифосфаткиназы — того же фермента, который превращает рибонуклеозиддифосфаты в трифосфаты.

Четвертый предшественник ДНК, дТТФ, синтезируется более сложным путем; к интермедиатам этого пути относится дУТФ, который в норме не является предшественником ДНК. Он образуется из дЦТФ путем дезаминирования и из дУДФ под действием нуклеозиддифосфаткиназы. Затем УТФ возвращается на уровень монофосфатов под действием специфической пирофосфатазы, метилируется с образованием дТМФ и снова возвращается на трифосфатный уровень в результате двух киназных реакций. Этот своеобразный путь синтеза кажется пустой тратой АТФ — тем не менее он, видимо, универсален для прокариот.

Е

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ И НУКЛЕОЗИДОВ

Большинство бактерий, если не все, способны осуществлять синтез всех нуклеозидтрифосфатов с помощью реакций, приведенных на рис. 7.10—7.14. Кроме того, они могут использо-

ТАБЛИЦА 7.2

БИОСИНТЕТИЧЕСКОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Предшественники	Аминокислоты
α -Кетоглутаровая кислота \longrightarrow Глутаминовая кислота	\longrightarrow Глутамин \longrightarrow Аргинин \longrightarrow Пролин } Группа глутаминовой кислоты
Щавелевоуксусная кислота \longrightarrow Аспарагиновая кислота	\longrightarrow Аспарагин \longrightarrow Метионин \longrightarrow Треонин \longrightarrow Изолейцин \longrightarrow Лизин ¹⁾ } Группа аспарагиновой кислоты
Фосфоенолпировиноградная кислота + Эритрозо-4-фосфат	\longrightarrow Триптофан \longrightarrow Фенилаланин \longrightarrow Тирозин } Группа ароматических аминокислот
3-фосфоглицериновая кислота \longrightarrow Серин	\longrightarrow Глицин \longrightarrow Цистеин } Группа серина
Пировиноградная кислота	\longrightarrow Аланин \longrightarrow Валин \longrightarrow Лейцин } Группа пировиноградной кислоты
Фосфорибозилпирофосфат + АТФ	\longrightarrow Гистидин

¹⁾ У некоторых водорослей и грибов лизин синтезируется из α -кетоглутаровой кислоты (см. текст).

вать основания — пурины и пиримидины или нуклеозиды, если эти соединения присутствуют в среде. Последовательности реакций, с помощью которых используются эти экзогенные соединения, названы путями синтеза из готовых фрагментов. В то время как пути биосинтеза нуклеотидов de novo у разных бактерий различаются лишь незначительно, способы использования готовых фрагментов различаются довольно существенно. На рис. 7.15 изображен путь синтеза нуклеотидов из готовых фрагментов, обнаруженный у энтеробактерий.

СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ И ДРУГИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТКИ

Для биосинтеза белков необходимо двадцать аминокислот. Только одна аминокислота, гистидин, имеет совершенно независимое биосинтетическое происхождение. Другие девятнадцать образуются из относительно небольшого числа основных промежуточных метаболитов в результате разветвления путей биосинтеза. С точки зрения их биосинтетического происхождения аминокислоты можно разделить на 5 групп, как показано в табл. 7.2. Кроме того, их биосинтетические пути приводят к синтезу некоторых других азотсодержащих компонентов клетки, которые не участвуют в синтезе белка (табл. 7.3). Ниже мы обсудим в общих чертах метаболические пути биосинтеза этих соединений.

ТАБЛИЦА 7.3

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ДРУГИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ КЛЕТКИ,
СВЯЗАННОЕ С ПУТЯМИ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ

Путь биосинтеза (группа аминокислот)	Другие азотсодержащие продукты
Глутаминовая кислота ¹⁾ Аспарагиновая кислота ¹⁾	Полиамины Диаминопимелиновая кислота, дипи- колиновая кислота
Ароматические	<i>n</i> -Оксибензойная кислота, <i>n</i> -амино- бензойная кислота
Серин	Пурины, порфирины
Пировиноградная кислота	Пантотеновая кислота

¹⁾ Кроме того, глутаминовая кислота, глутамин и аспарагиновая кислота служат донорами аминогрупп для ряда биосинтетических процессов.

ГРУППА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Мы уже рассмотрели происхождение двух аминокислот, относящихся к группе глутаминовой кислоты (самой глутаминовой кислоты и глутамина), там, где говорили об ассимиля-

ции аммиака. Две другие аминокислоты этой группы, пролин и аргинин, синтезируются из глутаминовой кислоты независимо (рис. 7.16).

ГРУППА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Исходная аминокислота группы — аспарагиновая — образуется при переаминировании щавелевоуксусной кислоты и может быть в дальнейшем аминирована с образованием аспарагина; эта реакция аналогична образованию глутамина из глутаминовой кислоты. Другие аминокислоты, относящиеся к этой группе, образуются в результате разветвления путей биосинтеза. Основная общая часть этих путей, приводящая к синтезу треонина, и побочные пути, приводящие к синтезу лизина, метионина и изолейцина, показаны на рис. 7.17.

Лизиновая ветвь биосинтетического пути показана на рис. 7.18. Этот путь биосинтеза лизина (который иногда называют путем образования диаминопимелиновой кислоты или ДАП-путем) характерен для всех прокариот, высших растений и большинства водорослей. У эвгленовых водорослей и высших грибов лизин синтезируется в результате другой последовательности реакций, которая называется путем α -аминоадипиновой кислоты или АА-путем (рис. 7.19). Некоторые фикомицеты синтезируют лизин по АА-пути, другие — по ДАП-пути. Многоклеточные животные не способны синтезировать лизин; они должны получать его с пищей.

Два интермедиата ДАП-пути синтеза лизина выполняют у прокариот особые функции. Диаминопимелиновая кислота является компонентом пептидогликана клеточной стенки, а дигидродипиколиновая кислота — непосредственный предшественник дипиколиновой кислоты, основного химического компонента эндоспор, обеспечивающего их устойчивость к нагреванию (гл. 10).

Метиониновая ветвь биосинтетического пути показана на рис. 7.20. У некоторых бактерий завершающая реакция биосинтеза (метилирование) может катализироваться двумя различными ферментами. Один из них нуждается в качестве кофактора в фолиевой кислоте, а другой — в витамине В₁₂. Некоторые бактерии, например *E. coli*, могут синтезировать фолиевую кислоту, но не способны синтезировать витамин В₁₂. Поэтому при росте на среде без витамина В₁₂ они синтезируют метионин с помощью реакции, зависящей от фолиевой кислоты, а в среде, содержащей витамин В₁₂, у них преобладает реакция, зависящая от витамина В₁₂.

Заключительные реакции пути синтеза пятой аминокислоты аспарагиновой группы, изолейцина, катализируются рядом ферментов, которые также катализируют аналогичные реакции биосинтеза валина — аминокислоты группы пировиноградной кислоты. Поэтому биосинтез изолейцина мы обсудим вместе с биосинтезом валина.

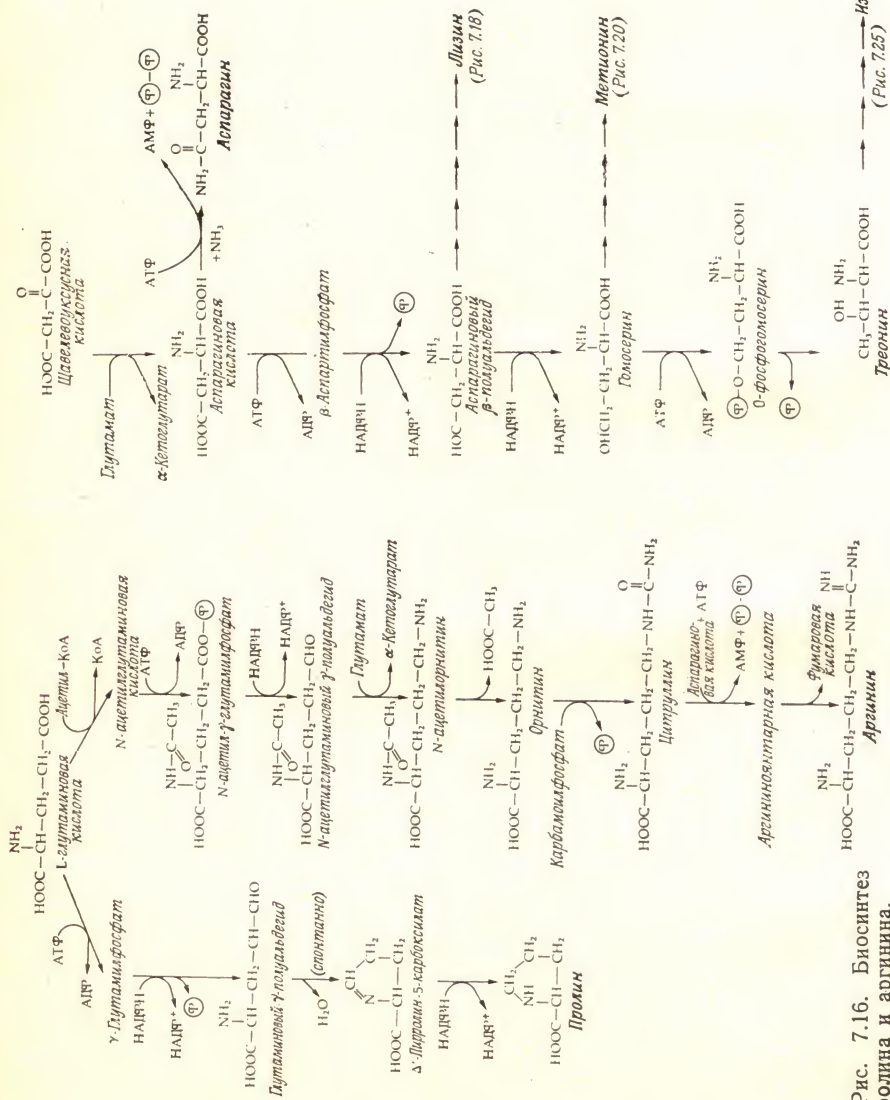
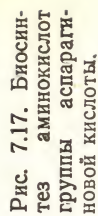


Рис. 7.16. Биосинтез пролина и аргинина.



Изолейцин
(Рис. 7.25)

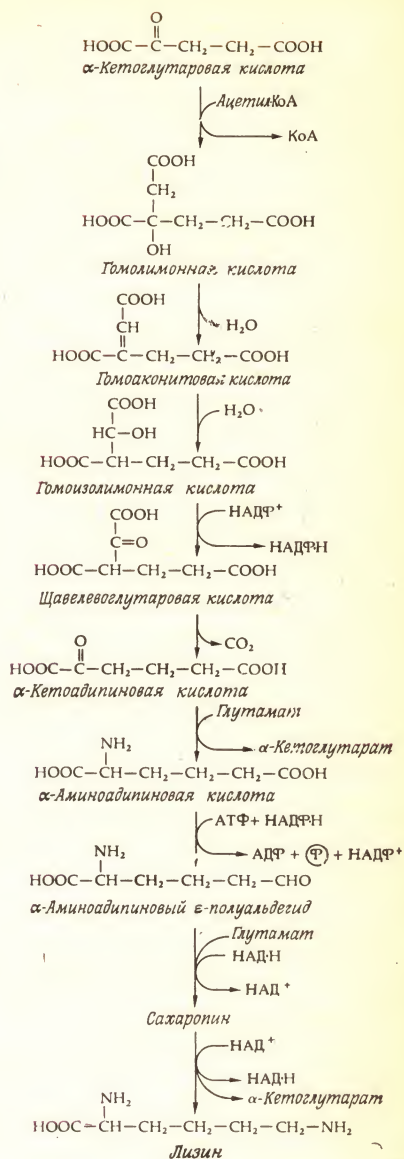
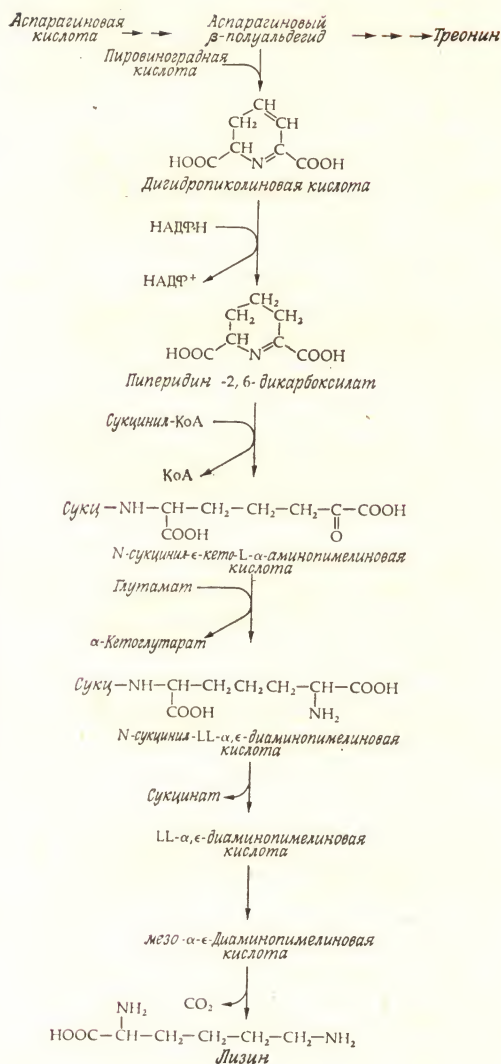


Рис. 7.18. Лизиновая ветвь биосинтеза аминокислот группы аспарагиновой кислоты (ДАП-путь).

Рис. 7.19. Путь биосинтеза лизина через α -аминоадипиновую кислоту (АА-путь).

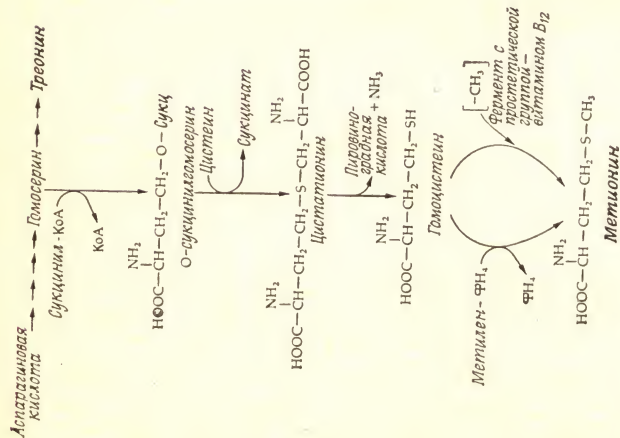


Рис. 7.20. Метионинная ветвь пути биосинтеза аминокислот группы аспарагиновой кислоты.

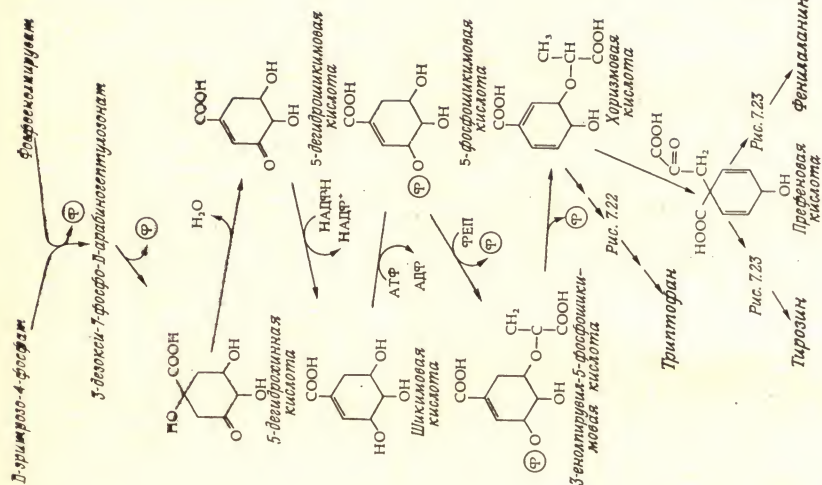


Рис. 7.21. Биосинтез ароматических аминокислот.

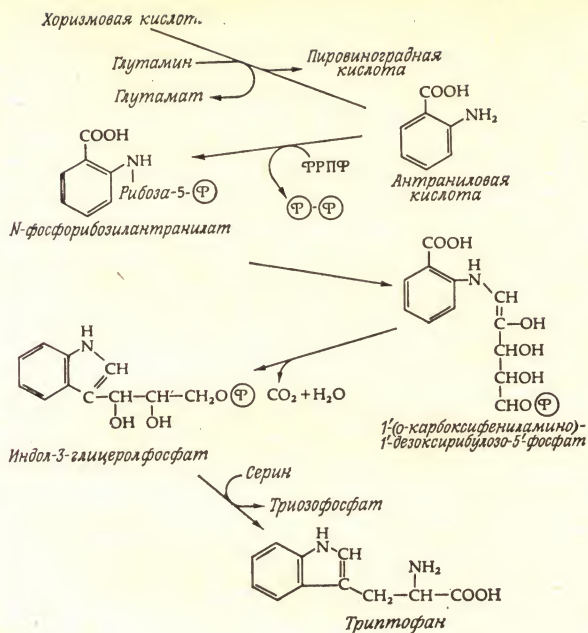


Рис. 7.22. Триптофановая ветвь пути биосинтеза ароматических аминокислот.

ГРУППА АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

К продуктам рассматриваемого в этом разделе биосинтетического пути относятся три аминокислоты: тирозин, фенилаланин и триптофан. Первая реакция пути — конденсация интермедиата пентозофосфатного цикла эритрозо-4-фосфата с интермедиатом гликолиза фосфоенолпируватом. Начальные стадии этого биосинтетического пути приводят к образованию хоризмовой и префеновой кислоты, расположенных в точках ветвления последовательности реакций, как показано на рис. 7.21. Триптофановая ветвь последовательности приведена на рис. 7.22, фенилаланиновая и тирозиновая ветви — на рис. 7.23. Путь синтеза ароматических соединений через промежуточное образование хоризмовой кислоты приводит также к образованию *n*-аминобензойной кислоты (одного из предшественников фолиевой кислоты) и *n*-оксибензойной кислоты (предшественника хинонов — компонентов некоторых цепей переноса электронов).

ГРУППЫ СЕРИНА И ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

Пути образования аминокислот группы серина (серина, глицина и цистеина) показаны на рис. 7.24.

Пути образования аминокислот группы пировиноградной кислоты (аланина, валина и лейцина), а также изолейцина,

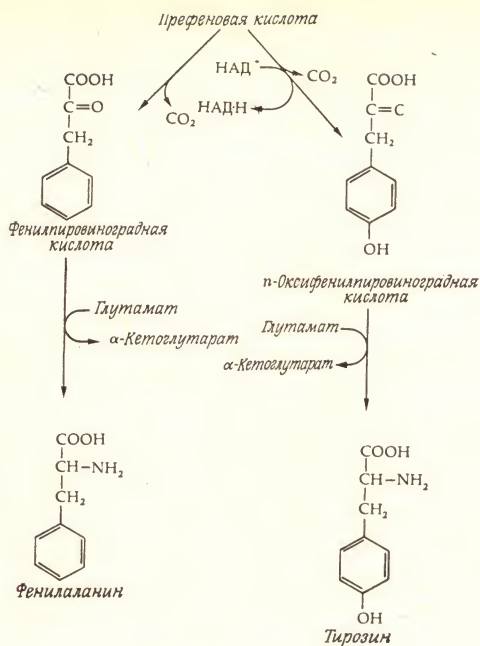


Рис. 7.23. Фенилаланиновая и тирозиновая ветви пути биосинтеза ароматических аминокислот.

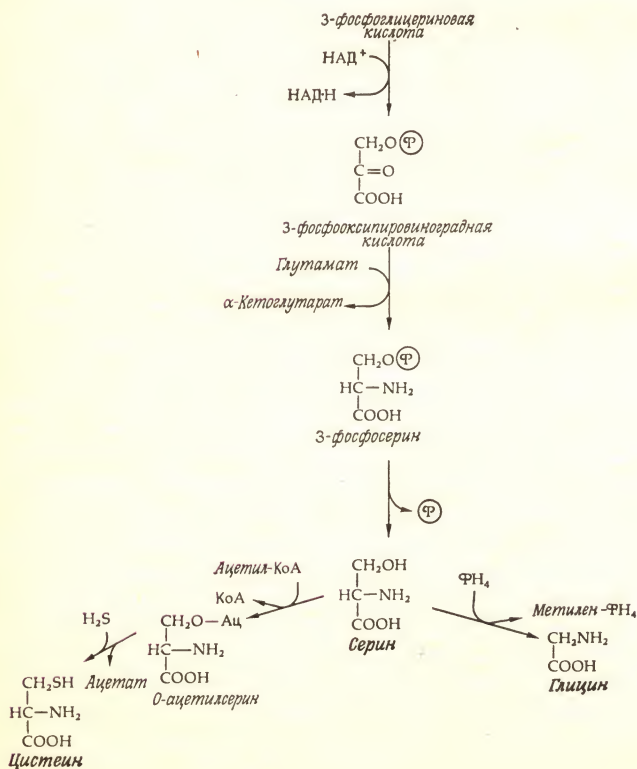
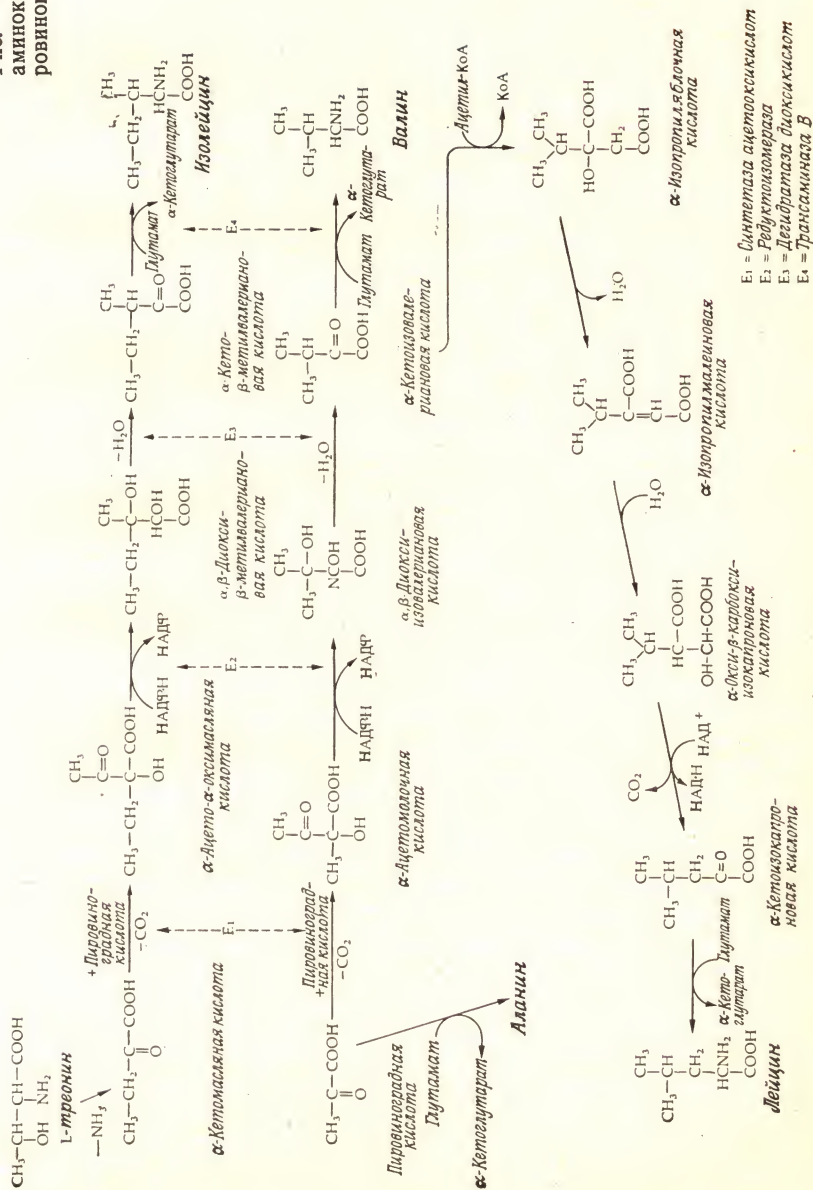


Рис. 7.24. Биосинтез аминокислот группы серина.

Рис. 7.25. Биосинтез аминокислот группы пировиноградной кислоты.



которые синтезируются одними и теми же ферментами, показаны на рис. 7.25. Пантотеновая кислота синтезируется через один из интермедиатов биосинтеза валина.

СИНТЕЗ ГИСТИДИНА

На рис. 7.26 изображен путь биосинтеза гистидина, сильно отличающийся от синтеза других аминокислот. Цепь из пяти атомов углерода — остов этой аминокислоты — происходит из ФРПФ; из них два атома входят в пятичленное имидазольное кольцо, а остальные три образуют боковую цепь. Три других атома имидазольного кольца имеют любопытное происхождение: фрагмент С—N происходит из пуринового ядра АТФ, а другой атом азота — из глутамина. Такое использование АТФ в качестве донора двух атомов пуринового ядра больше нигде не встречается. Его физиологический смысл заключается в том, что расщепление пуринового ядра АТФ приводит к образованию еще одного интермедиата биосинтеза, аминокимидазолкарбоксамид-рибонуклеотида (АИКАР), который в свою очередь является предшественником пуринов (рис. 7.10). Выше уже обсуждалась эта тесная связь между путями биосинтеза гистидина и пуринов (рис. 7.11).

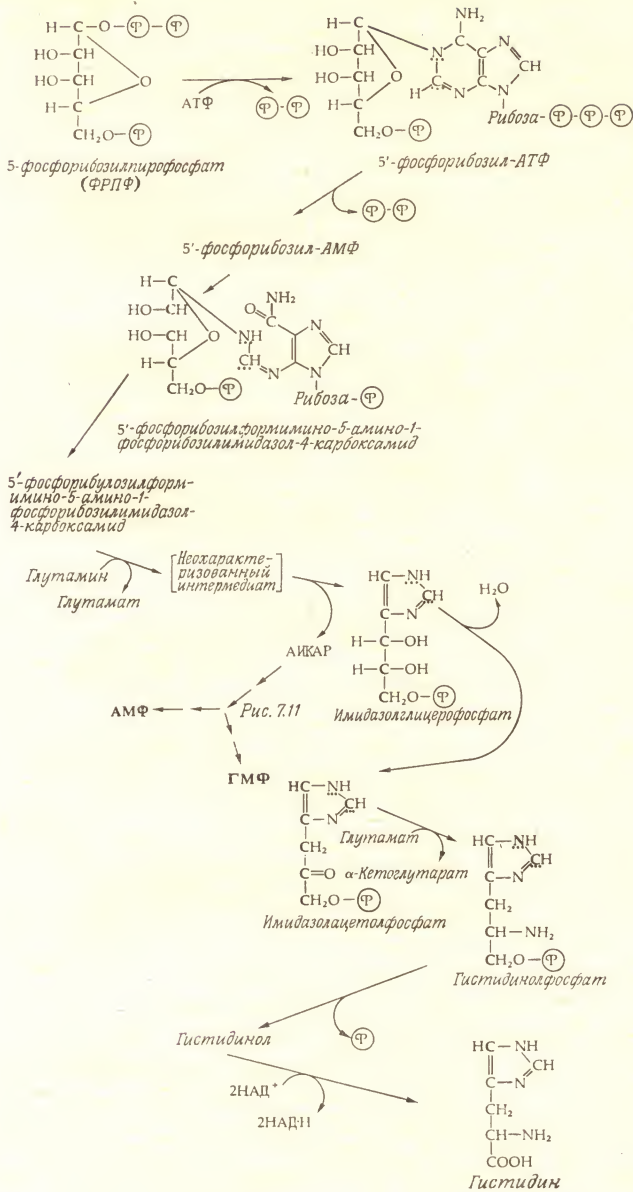
СИНТЕЗ ДРУГИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ УЧАСТИИ РЕАКЦИЙ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ

Пути биосинтеза аминокислот приводят также к образованию интермедиатов, превращающихся в другие важные компоненты клетки. В качестве примеров таких компонентов уже упоминались фолиевая кислота, *n*-оксibenзойная кислота, *n*-аминобензойная кислота, диаминопимелиновая кислота, дипикололиновая кислота и пурины. В количественном отношении важнейшим классом азотсодержащих соединений, образующихся в ходе реакций биосинтеза аминокислот у прокариот, являются полиамины (путресцин, спермидин и спермин). Эти соединения составляют значительную часть клетки и синтезируются в результате реакций аргининовой ветви пути синтеза глутаминовой кислоты (рис. 7.16).

Во время роста бактерий аргининовая ветвь дает примерно одинаковое количество полиаминов и аргинина. Путь синтеза полиаминов показан на рис. 7.27. Физиологическое значение путресцина как осмотического регулятора будет обсуждаться в гл. 10.

Путресцин может быть синтезирован из орнитина — интермедиата аргининовой последовательности реакций — или непосредственно из аргинина. В клетках, растущих в отсутствие экзогенного аргинина, преобладает синтез из орнитина. Если в клетки поступает аргинин, путь биосинтеза аргинина

Рис. 7.26. Биосинтез гистидина.



$\text{Глутаминовая кислота} \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow$

$$\begin{array}{c}
 \text{COOH} \\
 | \\
 \text{CH}-\text{NH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2\text{NH}_2
 \end{array}$$

Орнитин

$\text{CO}_2 \downarrow$

$$\begin{array}{c}
 \text{NH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{NH}_2
 \end{array}$$

Путресцин

$\text{H}_2\text{O} \leftarrow$

Мочевина

$\text{S-аденозилметионин} \rightarrow$

$$\begin{array}{c}
 \text{NH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2
 \end{array}$$

Спермин

$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$

Спермидин

$$\begin{array}{c}
 \text{COOH} \\
 | \\
 \text{CH}-\text{NH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{NH} \\
 | \\
 \text{C}=\text{NH} \\
 | \\
 \text{NH}_2
 \end{array}$$

Аргинин

$\text{CO}_2 \downarrow$

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_2-\text{NH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{NH} \\
 | \\
 \text{C}=\text{NH} \\
 | \\
 \text{NH}_2
 \end{array}$$

Азматин

СИНТЕЗ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ИЗ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ -\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2- \end{array}$$

ТАБЛИЦА 7.4
ЛИПИДЫ И ИХ ФУНКЦИИ

Липиды	Функции	
	у прокариот	у эукариот
<i>I. Липиды, содержащие жирные кислоты, связанные эфирной связью</i>		
А. Простые (мономерная единица одного типа)		
1. Поли-β-оксимасляная кислота	Запасное ве- щество	Нет
$\begin{array}{ccccccc} & \text{CH}_3 & & \text{O} & & \text{CH}_3 & & \text{O} \\ & & & & & & & \\ \text{HO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{O}- & \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{O}- \end{array}$		
Б. Сложные (жирные кислоты связаны эфирной связью с другими веществами)		
1. Глицериновые эфиры		
а. Нейтральные жиры		
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_3 \end{array}$	$\text{R}_{1,2,3}$ — остатки жирных кислот	Запасное ве- щество
б. Фосфолипиды (см. рис. 7.28)	Компонент мембраны	Компонент мембраны
в. Гликолипиды		
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{остаток сахара} \end{array}$	Компонент мембраны цианобак- терий	Компонент мембраны хлоропласт- ов
2. Жирные кислоты, связанные эфирной связью с аминасахарами Липид А (см. рис. 11.15)	Компонент липополи- сахаридно- го слоя клеточной стенки	Нет
<i>II. Липиды, содержащие изопреновые единицы</i>		
А. Полиизопрены		
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-) \end{array}$		
1. Каротиноиды C_{40} ($8 \times \text{C}_5$)	Фотозащита и поглоще- ние света	Поглощаю- щие свет пигменты
2. Стероиды C_{30} ($6 \times \text{C}_5$)	У большин- ства отсут- ствуют	Компонент мембраны

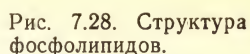
Липиды	Функции	
	у прокариот	у эукариот
3. Бактопренол C_{55} ($11 \times C_5$)	Компонент, к которому прикрепляются компоненты клеточной стенки во время синтеза	Нет
Б. Сложные соединения, содержащие изопреновые компоненты		
1. Хлорофилл	Компонент фотосинтезирующего аппарата	Компонент фотосинтезирующего аппарата
2. Хиноны	Компонент цепей переноса электронов	Компонент цепей переноса электронов

Некоторые липиды и их функции перечислены в табл. 7.4.

Фосфолипиды являются универсальными компонентами мембран. Их общая структура показана на рис. 7.28. Химическая природа остатка X, прикрепленного к фосфатной группе, определяет, к какой группе относится фосфолипид. У *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, мембранные липиды которых изучены наиболее подробно, основной фосфолипид мембраны — это фосфатидилэтаноламин (~75%). Обнаруживаются также в меньших количествах фосфатидилглицерин (~18%), кардиолипин (~5%) и лишь следы фосфатидилсерина (~1%).

СИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Жирные кислоты синтезируются отдельно, а затем с помощью эфирной связи включаются в сложные липиды. У бактерий имеется множество липидов, содержащих различное число атомов углерода и обладающих простой или разветвленной цепью. Они могут содержать или не содержать двойные связи, ОН-группы и циклопропановые кольца. Число жирных кислот у каждого отдельного вида бактерий строго определено. Например, *E. coli* содержит только шесть жирных кислот, а *Bacillus subtilis* восемь, причем только две жирные кислоты являются общими для обоих видов (табл. 7.5).



Относительно типов жирных кислот, встречающихся у бактерий, можно сделать некоторые обобщения. Подобно почти всем жирным кислотам, большинство жирных кислот бактерий содержит четное число атомов углерода. У эукариот полиненасыщенные жирные кислоты (содержащие более одной двойной связи) — обычный компонент набора липидов, но среди прокариот они встречаются только у цианобактерий.

Насыщенные жирные кислоты синтезируются в ходе последовательных реакций, изображенных на рис. 7.29. При этом важнейшую роль играет особый белок, так называемый *ацилпереносящий белок* (АПБ). Образование жирных кислот с длинной цепью начинается с переноса ацетильной группы с ацетил-КоА на АПБ. Этот комплекс служит акцептором, на который последовательно переносятся двухуглеродные фрагменты (C_2 -фрагменты). Донором C_2 -фрагментов служит малонил-КоА, образующийся путем карбоксилирования ацетил-КоА; при переносе C_2 -фрагмента освобождается CO_2 и регенерируется свободный АПБ. В результате переноса C_2 -фрагмента на конце продукта оказывается ацетильная группа, которая в ходе последующих реакций восстанавливается, дегидрируется и снова восстанавливается. В итоге образуется комплекс АПБ с ненасыщенным ацильным остатком, содержащим два дополнительных атома углерода. При повторении этого ряда реакций цепь жирной кислоты постепенно удлиняется, пока не достигается длина, характерная для соединения, присущего данной бактерии (обычно от C_{14} до C_{18}).

Мононенасыщенные жирные кислоты образуются у различных бактерий с помощью одного из двух путей (табл. 7.6), аэробного или анаэробного (последний встречается как у анаэробов, так и у аэробов).

285 Аэробный путь заключается в последующей модификации полностью синтезированных насыщенных жирных кислот, в

ТАБЛИЦА 7.5
СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛИПИДАХ КЛЕТОК *E. COLI* И *B. SUBTILIS*

Число атомов углерода	14	14	14	15	15	16
Число двойных связей	0	0	0	0	0	0
Число гидроксильных групп	0	1	0	0	0	0
Структура ¹⁾	Нормальная	Нормальная	Изо	Анти-изо	Изо	Нормальная
Название	Миристиновая	β -Окси-миристиновая				Пальмитиновая
Содержание в <i>E. coli</i> , % ²⁾	6,1	4,8	0	0	0	37,1
Содержание в <i>B. subtilis</i> , % ³⁾	Следы	0	3,9	36,6	12,1	6
Число атомов углерода	16	16	17	17	17	18
Число двойных связей	1	0	0	0	0	1
Число гидроксильных групп	0	0	0	0	0	0
Структура ¹⁾	Нормальная	Изо-	Анти-изо	Изо	Цикло	Нормальная
Название	Пальмитолеиновая					цис-Вакциновая
Содержание в <i>E. coli</i> , % ²⁾	28	0	0	0	3,2	20,8
Содержание в <i>B. subtilis</i> , % ³⁾	0	11,1	14,4	15,9	0	0

¹⁾ «Нормальная» означает неразветвленную цепь жирной кислоты; «Изо» означает, что к предпоследнему атому углерода присоединена метильная группа; «Антиизо» означает, что метильная группа присоединена к третьему атому углерода с конца; «Цикло» означает, что жирная кислота содержит циклопропановое кольцо.

²⁾ Данные из работы Marr, Ingraham, Effect of temperature of the composition of fatty acids in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., 84, 1260 (1962).

³⁾ Пересчитанные данные из работы Kaneda, Fatty acids in the genus *Bacillus*, J. Bacteriol., 93, 894 (1967).

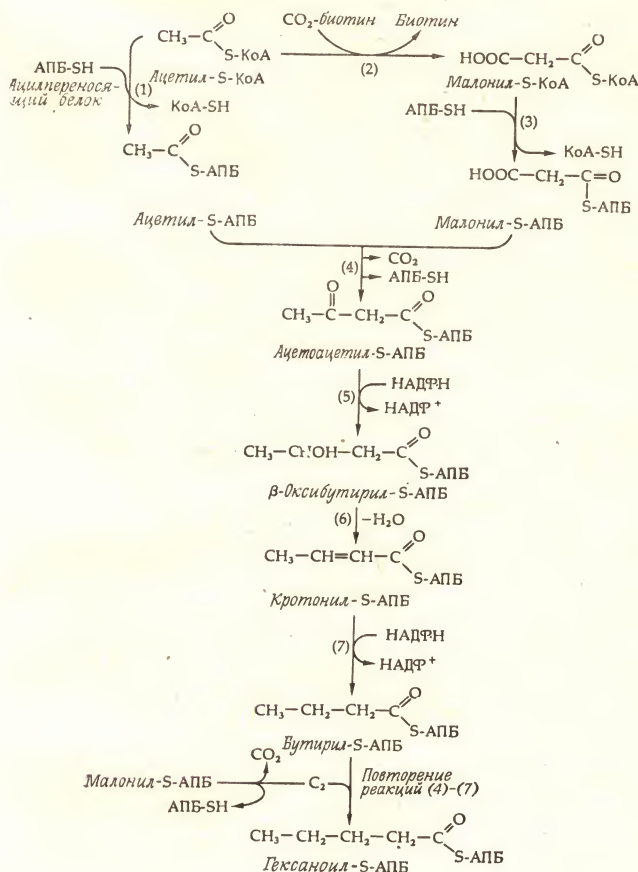
ТАБЛИЦА 7.6
МЕХАНИЗМЫ СИНТЕЗА МОНОНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
У РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Анаэробный путь	Аэробный путь
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.
Фотосинтезирующие бактерии	Грибы
Цианобактерии	Простейшие
	Животные

Рис. 7.29. Механизм синтеза насыщенных жирных кислот из ацетил-S-CoA у *E. coli*. Показана последовательность реакций, в результате

которой синтезируется гексаноил-(C₆)-S-АПБ. В дальнейшем путем переносов ацетильных групп от малонил-S-АПБ и последующих восста-

новлений [повторение реакций (4) — (7)] образуются неразветвленные жирные кислоты все большей длины с четным числом атомов углерода.



то время как при анаэробном пути образование ненасыщенной связи происходит во время элонгации цепи жирной кислоты. Для аэробного пути требуется непосредственное участие молекулярного кислорода (рис. 7.30).

Реакции анаэробного пути приведены на рис. 7.31. C₁₀-оксацильный интермедиат, β -оксидеканоил-АПБ, может вступить в обычные реакции образования ненасыщенной связи, приводящие к образованию насыщенных жирных кислот с более длинной цепью, или может претерпеть дегидрирование, приводящее к синтезу соответствующих мононенасыщенных жирных кислот. В случае анаэробного пути положение двойной связи в углеродной цепи конечных продуктов определяет-

Рис. 7.30. Образование аэробным путем мононенасыщенной жирной

кислоты, пальмитолеиновой, из соответствующей

насыщенной жирной кислоты, пальмитиновой.

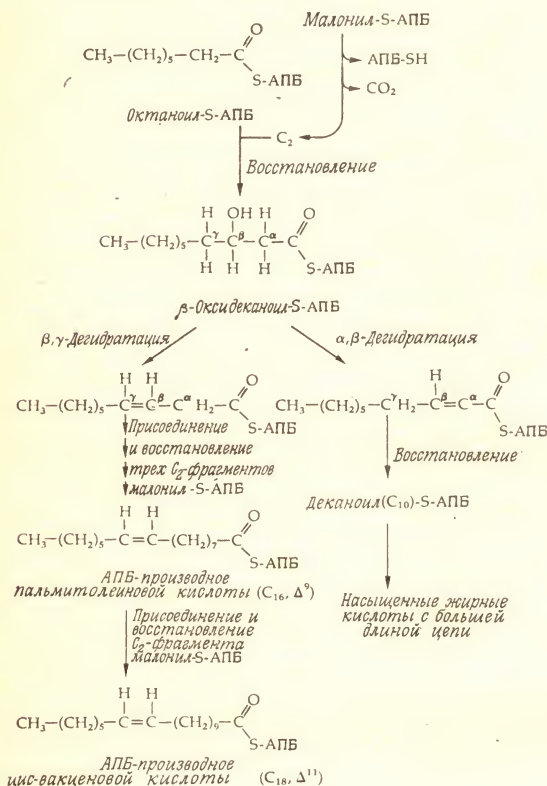
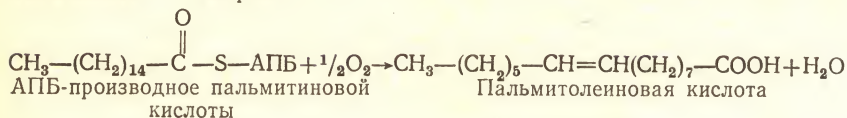


Рис. 7.31. Анаэробный путь синтеза мононенасыщенных жирных кислот, характерный для многих бактерий; показана его связь с биосинтезом насыщенных жирных кислот.

ся тем, в какой момент биосинтеза включается этот путь. Последующее удлинение цепи приводит к тому, что двойная связь располагается между 9 и 10 атомами углерода в C₁₆-продукте (пальмитолеиновая кислота). Однако в C₁₈-продукте двойная связь будет расположена между 11 и 12 атомами углерода. Поэтому бактерии, в которых используется анаэробный путь, в качестве мононенасыщенной жирной C₁₈-кислоты содержат цис-вакценовую кислоту, а не олеиновую кислоту — продукт прямой реакции образования ненасыщенной связи в стеариновой кислоте в результате реакций аэробно-го пути.

СИНТЕЗ ФОСФОЛИПИДОВ

Фосфолипиды синтезируются из жирных кислот и интермедиата гликолиза — диоксиацетонфосфата — в ходе реакций, показанных на рис. 7.32. Диоксиацетонфосфат восстанавливается до глицерол-3-фосфата, который затем этерифицируется двумя остатками жирных кислот. Образовавшийся диглицерид, фосфатидная кислота, активируется с помощью ЦТФ и превращается в ЦДФ-диглицерид, вступающий в реакции переноса с участием серина и α -глицерофосфата, в которых освобождается ЦМФ. Продукт реакции, содержащий серин — фосфатидилсерин, — составляет небольшую часть фосфолипидов. Основную часть составляет продукт его декарбоксилирования, фосфатидилэтаноламин. Реакция ЦДФ-диглицерида с α -глицерофосфатом приводит к синтезу других фосфолипидов — фосфатидилглицерина и кардиолипина.

СИНТЕЗ ПОЛИИЗОПРЕНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Некоторые компоненты клетки имеют углеродный скелет, состоящий из повторяющихся C_5 -фрагментов, обладающих структурой изопрена. Эти *полиизопреновые соединения* синтезируются исключительно из ацетильных групп; однако механизм элонгации цепи в этом случае заметно отличается от механизма синтеза жирных кислот, начиная с C_4 -фрагмента (рис. 7.33). Ацетоацетил-КоА соединяется с ацетил-КоА «голова к голове» и дает после перегруппировки мевалоновую кислоту — разветвленную C_6 -кислоту. Она в свою очередь превращается в результате двух последовательных фосфорилирований и декарбоксилирования в изопентенилпирофосфат — активированное C_5 -соединение, из которого синтезируются полиизопреновые соединения. На рис. 7.34 показаны последовательные стадии синтеза C_{15} - и C_{20} -производных из этого интермедиата. Соединение двух молекул C_{15} -производного фarnезилпирофосфата «хвост к хвосту» дает сквален, предшественник стеролов. Аналогичное соединение двух молекул C_{20} -производных дает фитоин, предшественник каротиноидов. C_{15} - и C_{20} -полиизопреновые спирты — фarnезол и фитоин — представляют собой компоненты хлорофиллов. Дальнейшее удлинение цепи соединением звеньев «голова к хвосту» дает полиизопреновые соединения, содержащие от 50 до 60 атомов углерода, которые входят в состав хинонов.

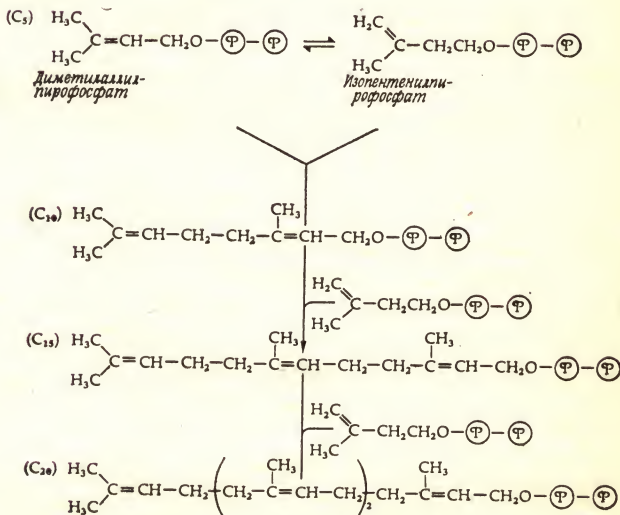
СИНТЕЗ ПОРФИРИНОВ

Каждая из множества различных органических молекул, служащих коферментами, или простетическими группами ферментов, синтезируется с помощью особого биосинтетического пути. В качестве примера опишем синтез *порфиринов*. Они

Рис. 7.32. Пути образования основных групп фосфолипидов у *E. coli*.



Рис. 7.34. Элонгация цепи в ходе биосинтеза полиизопренов.



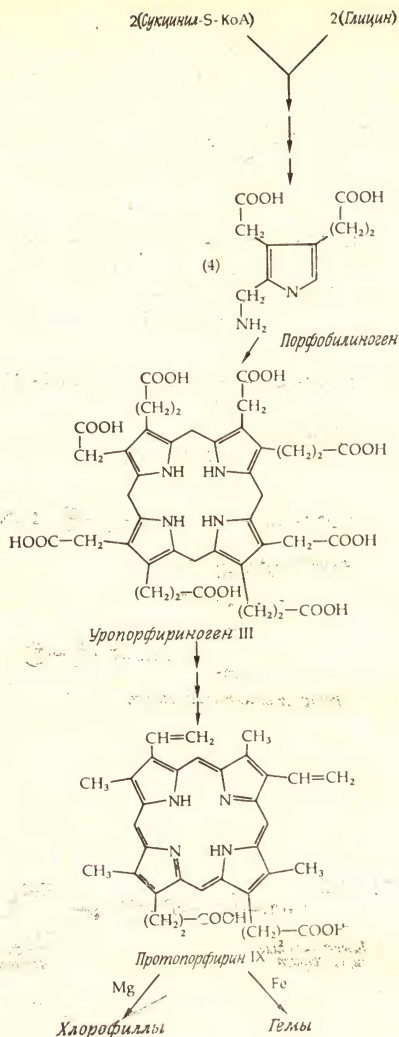


Рис. 7.35. Общая схема синтеза порфиринов.

делятся на две основные группы: железосодержащие гемы, служащие простетическими группами цитохромов и многих других ферментов, называемые в совокупности *геминowymi белками*; и магнийсодержащие хлорофиллы. Витамин В₁₂ — предшественник простетической группы некоторых ферментов, катализирующих перенос одноуглеродных фрагментов, синтезируется из одного из интермедиатов пути биосинтеза порфиринов.

Синтез порфиринов начинается с конденсации аминокислоты глицина с сукцинил-КоА, после которой через три стадии образуется порфобилиноген (рис. 7.35). При конденса-

ции 4 молекул этого интермедиата появляется тетрапиррольное ядро уропорфириногена III; в результате последующих модификаций и окисления образуется протопорфирин IX. Введение в эту молекулу атома железа, связанного хелатной связью, приводит непосредственно к синтезу гема. В другом случае, если образуется хелатная связь кольца с магнием, в ходе длинного ряда последовательных реакций образуется хлорофилл, характерный для данной группы фотосинтезирующих организмов. Большинство реакций синтеза хлорофилла являются общими для всех хлорофиллов; расхождение биосинтетических путей, в результате которого образуются различные хлорофиллы, характерные для данных растений и бактерий, происходит в конце всей последовательности реакций биосинтеза.

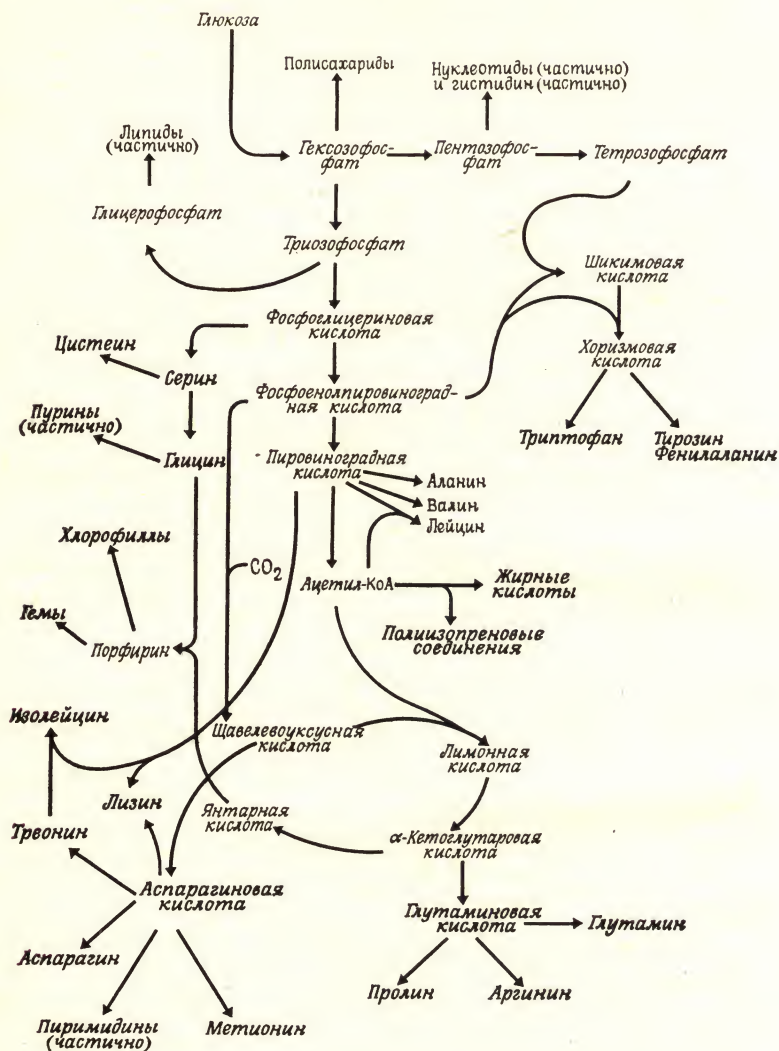
ВЗАИМОСВЯЗЬ ПУТЕЙ КАТАБОЛИЗМА И БИОСИНТЕЗА

В предыдущих разделах обсуждались пути синтеза в клетке самых разных биосинтетических интермедиатов. Прежде чем продолжать изложение, полезно суммировать сказанное в виде карты метаболизма (рис. 7.36). Глядя на эту карту, становится очевидным, что отдельные пути биосинтеза связаны между собой реакциями, играющими наряду с другими (т. е. реакциями пути Эмбдена — Мейергофа и ЦТК) важную роль в метаболизме органических субстратов, приводящем к образованию АТФ.

У гетеротрофных организмов имеется два потока углерода: часть его входит в конечные продукты катаболизма, а часть отводится в виде интермедиатов биосинтетических путей. В то же время у автотрофных организмов поток углерода ведет исключительно к биосинтезу, давая различные биосинтетические интермедиаты в результате тех последовательностей реакций, которые у гетеротрофов приводят к образованию АТФ. Интересный пример действия этого принципа — использование некоторых реакций ЦТК облигатными хемоавтотрофами и облигатными фотоавтотрофами. Эти организмы не способны окислять экзогенные органические субстраты, и, следовательно, ЦТК не играет у них никакой роли в образовании АТФ. Тем не менее эти организмы синтезируют все ферменты ЦТК, кроме α -кетоглутаратдегидрогеназы. Отсутствие этого фермента нарушает цикличность системы реакций, но не влияет на ее биосинтетические функции — образование α -кетоглутаровой, янтарной и шавелевоуксусной кислот. На рис. 7.37 показано, как эти интермедиаты образуются у автотрофов.

У факультативных анаэробов, таких, как *E. coli*, при росте за счет брожения в условиях избытка сахаров реакции ЦТК функционируют так же как у автотрофов; цикл наруша-

Рис. 7.36. Обобщенная карта метаболизма, на которой показано происхождение основных органических соединений клетки из нескольких ключевых продуктов метаболизма глюкозы.

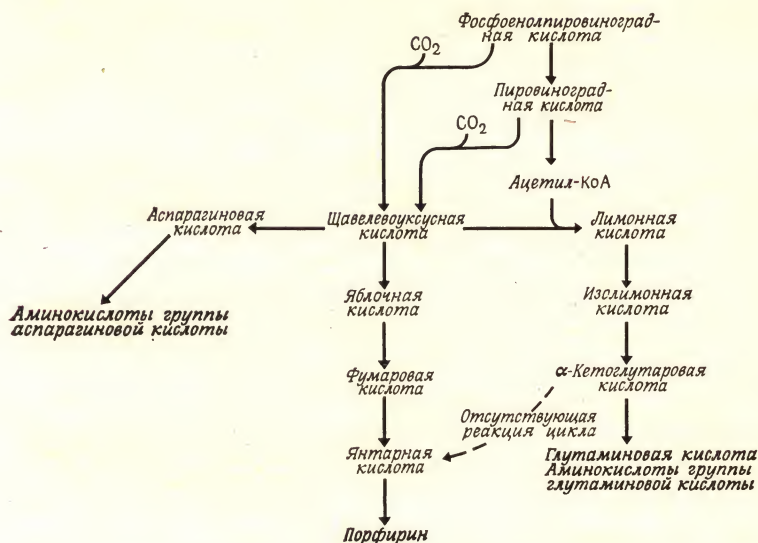


ется между α -кетоглутаровой и янтарной кислотами. Однако клетки *E. coli* способны к аэробному окислению органических соединений. В отличие от автотрофов они могут синтезировать α -кетоглутаратдегидрогеназу, необходимую для функционирования цикла в качестве АТФ-образующей системы. Поэтому при аэробном росте работает весь цикл, выполняя одновременно дыхательную и биосинтетическую функции.

Рис. 7.37. Биосинтетические функции реакций ЦТК у облигатных ав-

тотрофов. У этих организмов цикл прерывается из-за отсутствия

α -кетоглутаратдегидрогеназы.



БИОСИНТЕЗ МАКРОМОЛЕКУЛ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Белки и нуклеиновые кислоты представляют собой биополимеры, состоящие из субъединиц (мономеров), связанных друг с другом связями, характерными для каждого класса макромолекул (рис. 7.38). Расщепление всех биополимеров на свободные субъединицы может происходить при гидролизе. Таким образом, биосинтез биополимеров заключается в соединении субъединиц путем реакций, которые с формальной химической точки зрения обратны гидролизу, т. е. реакций дегидратации.

Биополимеры могут быть гидролизованы до субъединиц химически или ферментативно. Их биосинтез путем простой дегидратации термодинамически невыгоден: в условиях клетки, когда все вещества растворены в воде, расщепление путем гидролиза преобладает над синтезом путем дегидратации. Поэтому синтез всех биополимеров осуществляется путем предварительной химической активации мономера. Такая активация требует расхода АТФ и состоит в присоединении мономера к молекуле-переносчику. Последующая полимеризация происходит путем переноса мономера с переносчика на растущую цепь полимера, что является термодинамически выгодной реакцией. Активированные формы мономеров основных классов биополимеров приведены в табл. 7.7.

Рис. 7.38. Природа связей, соединяющих мономерные единицы основных классов биологических полимеров

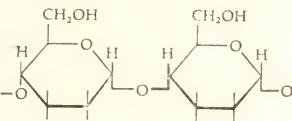
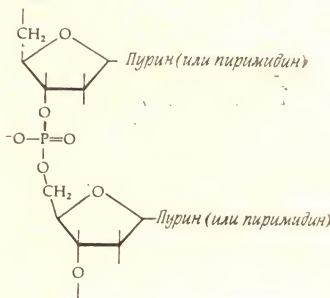
Полимер	Название связи	Строение связи
Белок	Пептидная	$R_1 - \text{CH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH} - \text{C}(=\text{O}) - R_2$
Полисахарид	Гликозидная	
Нуклеиновая кислота	Фосфодиэфирная	

ТАБЛИЦА 7.7

БИОПОЛИМЕРЫ, ИХ МОНОМЕРНЫЕ ЕДИНИЦЫ И АКТИВИРОВАННЫЕ ФОРМЫ МОНОМЕРОВ

Биополимер	Мономер ¹⁾	Активированная форма мономера
Белок	Аминокислоты	Аминоацил-тРНК
Нуклеиновая кислота	Нуклеозидмонофосфаты	Нуклеозидтрифосфат
Полисахариды	Сахара	Нуклеозиддифосфатсахар

¹⁾ Продукт гидролиза.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ

Бактериальная клетка способна синтезировать несколько тысяч различных белков, каждый из которых содержит в среднем примерно 200 аминокислотных остатков, связанных вместе в определенной последовательности. Информация, необходимая для того, чтобы направлять синтез этих белков, закодирована в последовательности нуклеотидов ДНК, большая часть которой находится в форме двухцепочечной кольцевой молекулы — бактериальной хромосомы (некоторые бактерии содержат также небольшие кольцевые молекулы, которые называются плазмидами, см. гл. 15). В процессе репликации хромосома с высокой точностью удваивается,

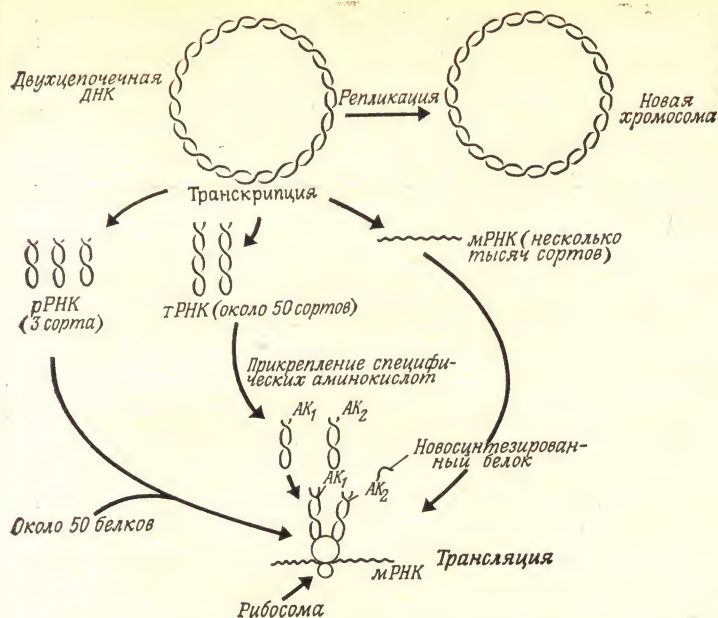


Рис. 7.39. Общий план синтеза нуклеиновых кислот и белков.

обеспечивая таким образом передачу информации клеткам-потомкам и давая им возможность синтезировать те же самые белки.

Процесс передачи информации, закодированной в хромосоме и определяющей порядок, в котором аминокислоты полимеризуются в белки, включает две стадии: транскрипцию и трансляцию (рис. 7.39).

Транскрипция. Информация, содержащаяся в одной из цепей ДНК, транскрибируется в РНК, т. е. цепь ДНК служит матрицей, на которой полимеризуется единственная цепь РНК с длиной, соответствующей одному или нескольким генам в бактериальной хромосоме. Один класс этих молекул РНК, которые называются информационными, или матричными РНК (мРНК), переносит закодированную в ДНК информацию к белоксинтезирующей системе.

Трансляция. Синтез белка происходит на рибонуклеопротеидных частицах, прикрепляющихся к молекуле мРНК, которые называются рибосомами [они состоят из рибосомной РНК (рРНК) и белка]. Информация, содержащаяся в молекулах мРНК, транслируется в молекулы белка с помощью особого класса молекул РНК, называемых транспортными РНК (тРНК). Эти молекулы многофункциональны: они способны связываться с рибосомой, присоединяться к определенным аминокислотам и узнавать определенные последовательности нуклеотидов в мРНК. Молекулы тРНК каждого вида узнают определенную последовательность из трех нуклеотидов (кодон) в молекуле мРНК и могут быть присоединены

к определенной аминокислоте. Таким образом, различные аминокислоты подаются при помощи узнающих их молекул тРНК к рибосоме, где они полимеризуются в белок с образованием последовательности аминокислот, кодируемой мРНК.

Детали этих процессов будут обсуждаться в последующих разделах.

СИНТЕЗ ДНК

Структура молекулы ДНК, определенная Уотсоном и Криком в 1953 г., сразу же позволила предположить, каким образом ДНК может точно реплицироваться. ДНК представляет собой двойную спираль, каждая цепь которой состоит из молекулы 2'-дезоксирибозы, связанных друг с другом фосфодиэфирными связями между 3'-гидроксильной группой одного остатка и 5'-гидроксильной группой следующего. Пуриновые и пиримидиновые основания (прикрепленные в первом положении дезоксирибозы) выступают из цепей по направлению к середине молекулы, удерживая две цепи вместе благодаря водородным связям в парах пуринов с пиримидинами. Гуанин спаривается с цитозином (Г—Ц), а аденин — с тиминном (А—Т) (рис. 7.40). Когда основания находятся в энергетически наиболее выгодной форме (кето-, а не енольная форма кислородсодержащих оснований и амина-, а не иминоформа аминированных оснований), только эти пары располагаются на подходящем для образования водородных связей расстоянии. Две водородные связи, образующиеся между аденином и тиминном, и три водородные связи, образующиеся между гуанином и цитозином, показаны на рис. 7.41. Таким образом, вся молекула представляет собой *линейную последовательность нуклеотидных пар*; расположенные в строго определенном порядке, эти пары образуют генетическую матрицу, содержащую всю необходимую информацию, определяющую структуру и функционирование данной клетки.

АНТИПАРАЛЛЕЛЬНАЯ СТРУКТУРА ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

Каждая цепь двойной спирали представляет собой полярную структуру; ее полярность определяется последовательным соединением полярных субъединиц — дезоксирибонуклеотидов. Как показано на рис. 7.42, каждый нуклеотид имеет 5'-фосфатный конец и 3'-гидроксильный конец; при соединении нуклеотидов фосфодиэфирными связями образуется полярная цепь, также имеющая 5'-фосфатный и 3'-гидроксильный концы.

Две цепи двойной спирали *антипараллельны* (т. е. имеют *противоположную полярность*). Это показано на рис. 7.43; если рассматривать его сверху вниз, видно, что левая цепь идет в направлении от 5'-конца к 3'-концу, а правая цепь

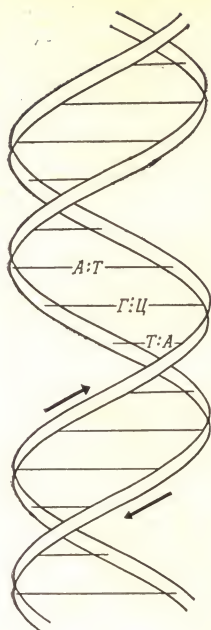
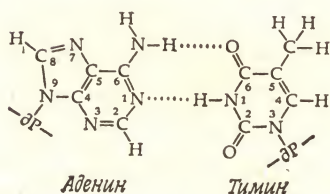
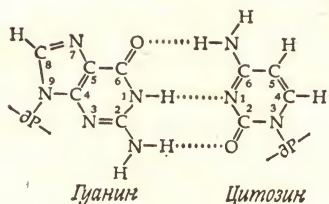


Рис. 7.40. Схематическое изображение двойной спирали ДНК. Проходящие снаружи полосы обозначают две дезоксирибозофосфатные цепи. Параллельные линии между ними изображают пары пуриновых и пиримидиновых оснований, которые удерживаются вместе водородными связями. Примеры такого связывания показаны в центральной части ри-



сунка, причем каждая точка между основаниями соответствует одной водородной связи. Направление стрелок показывает направление $3' \rightarrow 5'$ фосфодиэфирных связей между соседними остатками 2'-дезоксирибозы (Mandelstam, McQuillen, Biochemistry of bacterial growth, 2nd ed., N. Y., Wiley, 1973).

Рис. 7.41. Спаривание аденина с тиминном и гуанина с цитозином с помощью водородных связей. Буквы дР обозначают остатки дезоксирибозы сахарофосфатного остова двойной спирали. Водородные связи показаны пунктиром.



имеет направление $3' \rightarrow 5'$. Значение антипараллельной структуры ДНК станет ясно при рассмотрении процесса репликации ДНК.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Полимеризация ДНК катализируется ферментами, называемыми ДНК-полимеразами. Для полимеризации помимо четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ) — субстратов реакции — необходимы 2 молекулы ДНК: одна из них играет роль матрицы, с которой взаимодействуют субстраты — молекулы дезоксинуклеозидтрифосфатов — в соответствии с правилами водородного связывания (Г с Ц и А с Т), а вторая молекула играет роль затравки, к которой в ходе полимеризации присоединяются нуклеотиды (рис. 7.44). Синтез ДНК происходит в направлении $5' \rightarrow 3'$ путем последовательного образования фосфодиэфирных связей между α -фосфатами 5'-дезоксинуклеозидтрифосфатов и

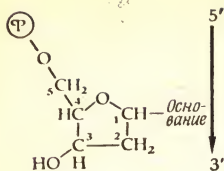
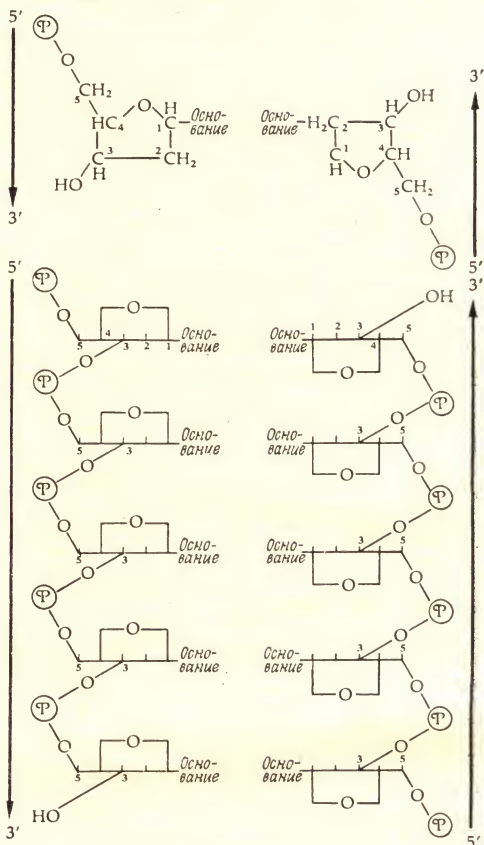


Рис. 7.42. Дезоксирибонуклеотид. Молекула полярна, так как имеет 3'-гидроксильную группу на одном конце и 5'-фосфатную группу на другом.

Рис. 7.43. Антипараллельность двойной спирали. Вверху показана полная структурная формула одной пары оснований. Ниже элементы двойной спирали по-

казаны схематически. Обратите внимание, что левая цепь идет сверху вниз в направлении 5'→3', а правая в направлении 3'→5'.



концевой 3'-гидроксильной группой затравки с одновременным высвобождением одной молекулы пирофосфата (ФФ_н) на каждый присоединенный нуклеотид. Матричная ДНК определяет последовательность присоединения дезоксинуклеотидов к молекуле ДНК-затравки.

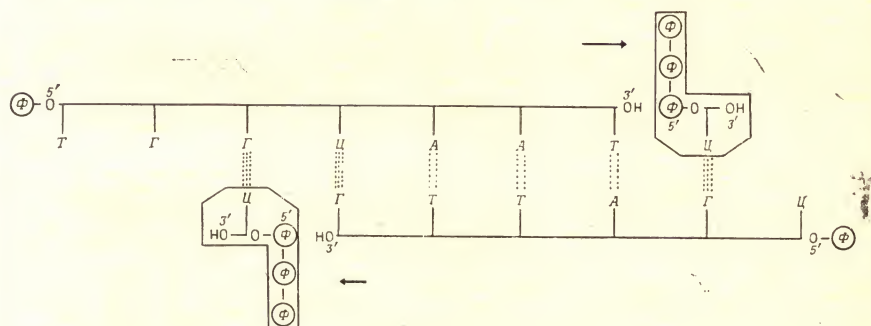
РЕПЛИКАЦИЯ

Действие ДНК-полимераз несложно и в общем изучено достаточно хорошо. Вместе с тем репликация интактной двухцепочечной бактериальной хромосомы — процесс чрезвычайно сложный, и многие вопросы, связанные с ним, остаются

Рис. 7.44. Схематическое изображение короткого фрагмента двухцепочечной ДНК с одноцепочечными участками на концах. Обе цепи удлиняются под действием ДНК-полимеразы, ката-

лизирующей присоединение дезоксирибонуклеозидтрифосфатов к 3'-концевым гидроксильным группам цепей. Слева матрицей служит верхняя цепь, а затравкой —

наоборот. Стрелки указывают направление последовательного присоединения дезоксирибонуклеотидов; при этом эщепляется пирофосфат.



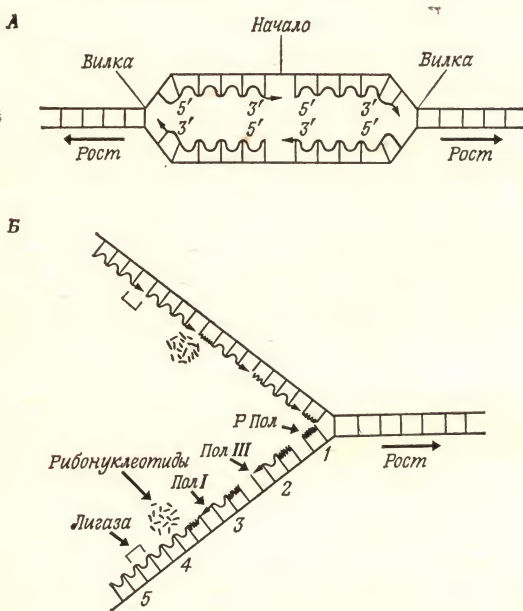
без ответа. Как указывалось выше, ДНК-полимеразы нуждаются в одноцепочечной матрице. Поэтому до того, как произойдет репликация, двухцепочечная хромосома должна с помощью какого-то пока неизвестного механизма разойтись на отдельные цепи хотя бы в одном месте. Потребность в первоначальной затравке удовлетворяется синтезом короткого комплементарного участка РНК на каждой из разделенных цепей ДНК (РНК-полимераза в затравке не нуждается). Затем происходит полимеризация с участием одноцепочечной ДНК-матрицы и РНК-затравки (рис. 7.45). Начиная от стартовой точки, репликация идет одновременно в обоих направлениях вдоль хромосомы¹⁾ (т. е. в хромосоме образуется «пузырь»); при этом формируются две репликативные «вилки», в которых, собственно, и осуществляется синтез ДНК. Поскольку репликация, катализируемая ДНК-полимеразой, может протекать только в направлении 5'→3' и цепи ДНК антипараллельны, репликация каждой из двух цепей ДНК в месте репликативной вилки происходит в противоположных направлениях. После того как на РНК-затравке под действием ДНК-полимеразы III полимеризуется примерно 100 нуклеотидов и образуются короткие цепи ДНК, прикрепленные к РНК (их иногда называют фрагментами Оказаки по имени открывшего их исследователя Р. Оказаки), полимеразы другого типа, ДНК-полимераза I, обладающая экзонуклеазной активностью, гидролизует фрагмент РНК и одновременно полимеризует вместо него новую ДНК. В конце концов ко-

¹⁾ В некоторых случаях репликация идет, начиная со стартовой точки, только в одном направлении. — Прим. перев.

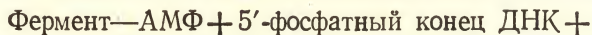
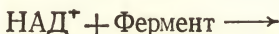
Рис. 7.45. Схематическое изображение этапов репликации бактериальной хромосомы. А. Часть реплицирующейся бактериальной хромосомы вскоре после того, как репликация началась в стартовой точке репликации. Новосинтезированные цепи ДНК (волнистые линии) образуются в направлении 5'→3' (указано стрелками), причем предшествующие цепи ДНК (прямые линии) используются в качестве матриц. В ходе этого процесса образуются две репликативные вилки, движущиеся в противо-

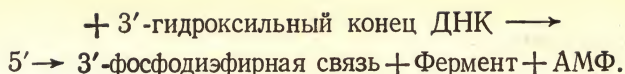
положных направлениях, пока они не встречаются на противоположной стороне кольцевой бактериальной хромосомы, завершая процесс репликации. Б. Одна из репликативных вилок изображена более крупным планом. Показано, как синтезируются и затем соединяются короткие фрагменты ДНК, образуя протяженную новую цепь ДНК. Для наглядности показаны четыре коротких фрагмента нуклеиновой кислоты на различных стадиях роста. В первом фрагменте 1 синтезируется РНК-затравка (угло-

щенная линия) под действием РНК-полимеразы (РПол). Затем на участке 2 происходит полимеризация ДНК под действием ДНК-полимеразы III (Пол III); на участке 3 оставшаяся РНК-затравка гидролизуется и одновременно полимеризует ДНК под действием экзонуклеазной и полимеразной активностей ДНК-полимеразы I (Пол I); наконец, готовые короткие фрагменты ДНК соединяются в непрерывную цепь (5) под действием ДНК-лигазы.



роткие куски ДНК, синтезированные таким путем, соединяются вместе, образуя непрерывную комплементарную копию исходных цепей ДНК. Это соединение происходит под действием фермента ДНК-лигазы, катализирующего две последовательные реакции:





ФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Образование РНК-затравки катализируется до сих пор не охарактеризованной ДНК-зависимой РНК-полимеразой; этот фермент, возможно, отличается от того, который участвует в транскрипции, так как чувствительности процессов транскрипции и репликации к антибиотикам рифампину различны.

У *E. coli* имеются три различные ДНК-полимеразы: полимеразы I (Пол I), полимеразы II (Пол II) и полимеразы III (Пол III). Пол III катализирует присоединение нуклеотидов к РНК-затравке, затем Пол I гидролизует эту затравку и синтезирует вместо нее ДНК. Роль Пол II пока неизвестна.

Для выяснения деталей процесса репликации необходимы многочисленные исследования. Тот факт, что мутации по крайней мере в семи различных генах (гены *dna*) блокируют репликацию, косвенно свидетельствует о сложности этого процесса; функции продуктов многих из этих генов пока неизвестны. Один из них должен обеспечивать раскручивание двойной спирали ДНК, подготавливая ее к репликации, другие — прикрепление ее к клеточной мембране, на которой, как предполагают, происходит репликация (гл. 11).

СИНТЕЗ РНК

Хотя функции РНК трех классов (мРНК, тРНК и рРНК) сильно различаются, механизм их синтеза одинаков. Весьма сложный фермент *ДНК-зависимая РНК-полимераза* [который обычно называют РНК-полимеразой (табл. 7.8)] осуще-

ТАБЛИЦА 7.8

СУБЪЕДИНИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Субъединица	Молекулярный вес	Число субъединиц в молекуле фермента		
Альфа (α)	41 000	2	} Кор-фермент }	} Голофермент ¹⁾
Бета (β)	155 000	1		
Бета-штрих (β')	165 000	1		
Сигма (σ)	86 000	1		

¹⁾ Голофермент начинает процесс транскрипции; кор-фермент катализирует дальнейшую полимеризацию.

ствляет полимеризацию четырех рибонуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ) и образует одиночную цепь РНК, комплементарную одной из цепей ДНК. Рибонуклеозидтрифосфаты спариваются с комплементарными ос-

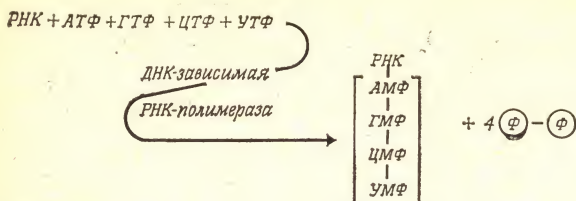


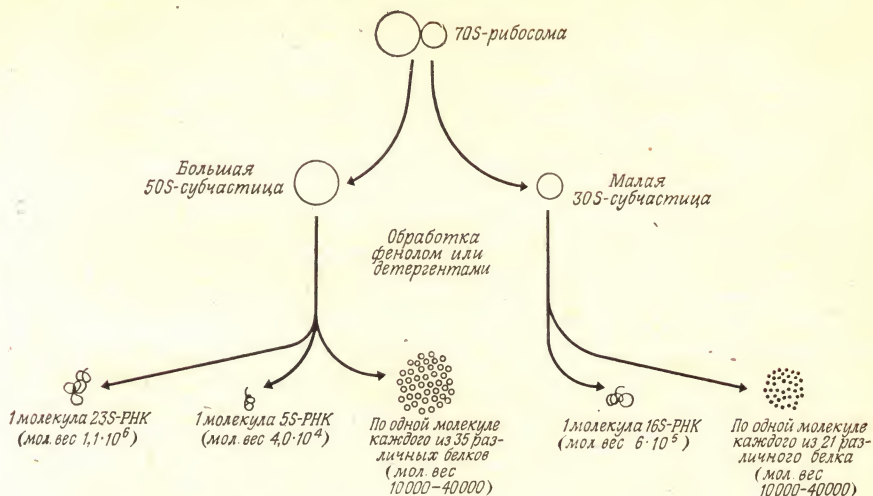
Рис. 7.46. Схема действия ДНК-зависимой РНК-полимеразы (транскрипция). Квадратные скобки означают, что приведенный порядок соединения нуклеотидов случаен.

нованиями цепи ДНК в соответствии с правилами образования пар оснований, обсуждавшимися выше (рис. 7.41), за исключением урацила, который спаривается с аденином вместо тимина. Урацил отличается от тимина только тем, что не содержит метильной группы в положении 5, и он спаривается с аденином так же, как и тимин. Затем рибонуклеотиды полимеризуются РНК-полимеразой с одновременным отщеплением пирофосфата.

Инициация транскрипции происходит в определенных участках бактериальной хромосомы, которые представляют собой короткие специфические последовательности пар оснований ДНК, называемые *промоторами*. Эти последовательности определяют также, какая из цепей ДНК будет транскрибироваться. Поскольку полимеризация происходит в результате образования фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой на растущем конце цепи РНК и α -фосфатной группой свободного нуклеозидтрифосфата, направление транскрипции вдоль двухцепочечной ДНК определяется тем, какая из цепей ДНК копируется. Полимеризация продолжается таким образом до тех пор, пока не транскрибируется один или несколько генов. Затем, когда в цепи ДНК встречается последовательность пар оснований, вызывающая освобождение молекулы РНК-полимеразы, синтез одной молекулы РНК заканчивается. Хотя в качестве матрицы функционирует только одна цепь ДНК, в различных участках бактериальной хромосомы в этой роли может выступать то одна, то другая цепь ДНК. Копируемая цепь и, следовательно, направление транскрипции варьируют по длине хромосомы, не подчиняясь какой-либо видимой закономерности. В результате транскрипции образуется одноцепочечная РНК. Однако в некоторых случаях (особенно в случае тРНК) цепь складывается сама на себя, образуя водородные связи между определенными комплементарными последовательностями оснований (урацил с аденином и цитозин с гуанином); в результате появляются двухцепочечные участки. Схема процесса транскрипции приведена на рис. 7.46.

Прокариоты в отличие от эукариот имеют еще один фермент, способный синтезировать РНК, полирибонуклеотид — нуклеотидилтрансферазу (полинуклеотидфосфорилазу). Он катализирует независимый от ДНК обратимый синтез РНК из нуклеозиддифосфатов, который сопровождается освобождением

Рис. 7.47. Состав рибосом прокариот.



50S- и 30S-субчастицы не содержат общих белков

дением ортофосфата. Этот фермент, по-видимому, имеется у всех прокариот, однако его физиологическое значение остается неясным.

СИНТЕЗ БЕЛКОВ

Все продукты транскрипции — мРНК, тРНК и рРНК — участвуют в синтезе белка. рРНК является компонентом рибосом, где происходит синтез белка. Функционально активная форма рибосомы прокариот, имеющая константу седиментации 70 S, может обратимо диссоциировать на 30 S- и 50 S-субчастицы при изменении в буфере концентрации Mg^{2+} . Молекулярный состав рибосом прокариот показан на рис. 7.47.

Рассмотрим биохимические стадии синтеза белка по отдельности.

АКТИВАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Активированная форма аминокислот, которая используется при полимеризации белков, представляет собой аминоацил-тРНК. Она синтезируется в две стадии, катализируемые ферментом из группы *аминоацил-тРНК-синтетаз*. Существует 20 таких ферментов, каждый из них специфичен для определенной аминокислоты и определенной молекулы тРНК¹⁾. Ами-

¹⁾ В клетке имеется более 20 различных сортов тРНК, так как в некоторых случаях одну и ту же аминокислоту могут акцептировать несколько различных молекул тРНК.

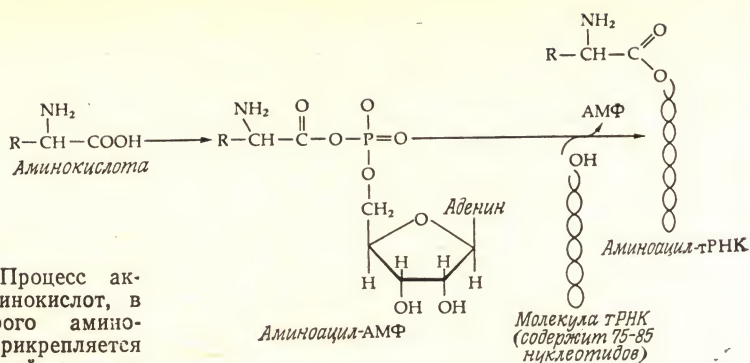


Рис. 7.48. Процесс активации аминокислот, в ходе которого аминокислота прикрепляется к определенной молекуле тРНК.

нокислота реагирует с АТФ и образует связанный с ферментом интермедиат — *аминоациладениловую кислоту*; затем аминоацильная группа переносится на свободную гидроксильную группу концевой остатка АМФ, который содержат все молекулы тРНК (рис. 7.48).

ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Рибосомная 30S-субчастица вместе с особой аминоацил-тРНК (одной из метионил-тРНК, к аминокислоте которой присоединен формильный остаток) соединяется со специфическим участком в молекуле мРНК, образуя комплекс инициации. Затем к комплексу присоединяется рибосомная 50S-субчастица и образуется 70S-рибосома, которая осуществляет полимеризацию. В данной реакции принимают участие три вспомогательных белка (они называются факторами инициации IF₁, IF₂ и IF₃); этот процесс требует затраты одной высокоэнергетической связи ГТФ.

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ С ОБРАЗОВАНИЕМ БЕЛКА

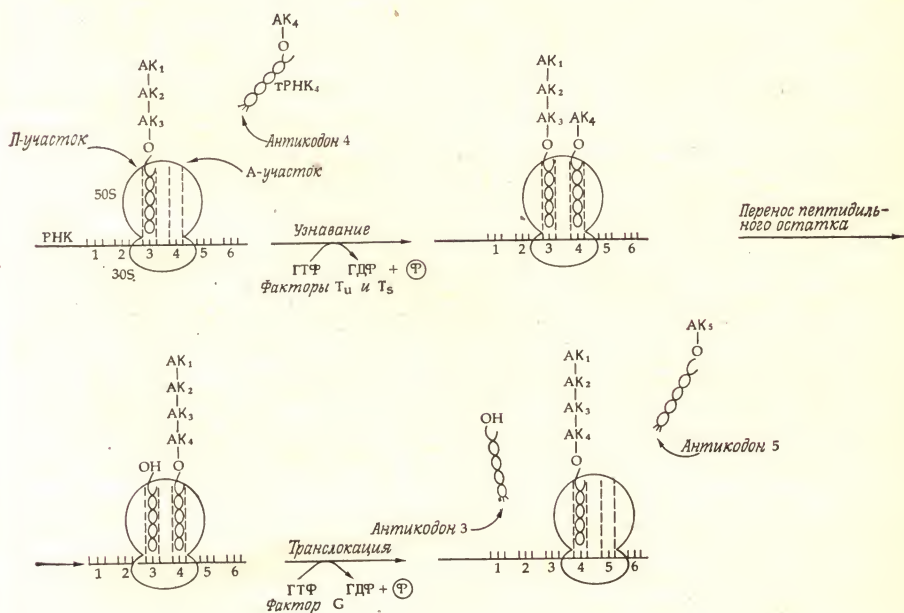
Присоединение каждой аминокислоты в процессе полимеризации состоит из следующей последовательности событий (рис. 7.49).

1. *Узнавание*. Молекула аминоацил-тРНК присоединяется к определенному участку 70S-рибосомы, который называется аминоацильным участком (А-участком) и в котором расположена последовательность трех оснований (кодон) молекулы мРНК. Чтобы могла произойти полимеризация, эти основания должны быть комплементарны трем основаниям (антикодону) в дистальном конце молекулы аминоацил-тРНК. Поскольку антикодон в тРНК соответствует аминокислоте, прикрепленной к молекуле, кодон в А-участке определяет, какая именно аминокислота будет присоединена к

Рис. 7.49. Последовательные этапы удлинения пептидной цепи. Аминокислоты (АК) пе-

ренумерованы в порядке их присоединения к пептиду; пронумерованные тройки черточек

изображают кодоны в молекуле мРНК.



растущему пептиду, который связан с другой молекулой тРНК, расположенной в другом месте рибосомы — пептидилном участке (П-участке). В стадии узнавания участвуют еще два вспомогательных белка (они называются факторами элонгации, T_u и T_s) и одна молекула ГТФ превращается в ГДФ.

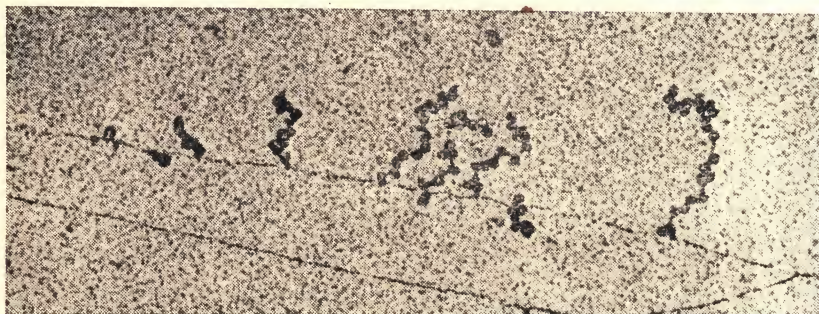
2. *Перенос пептидного остатка.* Затем пептидный остаток переносится на аминокислоту, прикрепленную к молекуле тРНК в А-участке; при этом образуется новая пептидная связь, и пептидная цепь удлиняется таким образом на один аминокислотный остаток. Перенос пептидного остатка катализируется самой 50 S-субчастицей рибосомы и не требует никаких дополнительных белков.

3. *Транслокация.* После переноса пептидного остатка тРНК, к которой он присоединен, перемещается в П-участок вместе с мРНК. Таким образом, свободная молекула тРНК вытесняется и в А-участок попадает следующий кодон. В транслокации участвует один вспомогательный белок (он называется фактором G), и гидролизуется еще одна молекула ГТФ.

Рис. 7.50. Электронная микрофотография участка хромосомы *E. coli*, на котором происходит одновременно транскрипция и трансляция. Горизонтальная линия в середине — ДНК. Отходящие от нее волнистые линии — молекулы мРНК с прикрепленными к ним

многочисленными рибосомами (полисомами). Постепенное увеличение длины мРНК на рисунке слева направо показывает, что в этом направлении идет транскрипция под действием ДНК-зависимой РНК-полимеразы (ее молекулы едва заметны в

месте соединения РНК и ДНК) и что транскрипция начинается вблизи левого края фотографии; $\times 62\ 350$ (Hamkall, Miller Jr., Electronmicroscopy of genetic material, Ann. Revs. Biochem., 42, 379, 1973).



4. *Терминация цепи.* Благодаря повторяющимся актам узнавания, переноса пептидильного остатка и транслокации к пептидной цепи последовательно присоединяются остатки аминокислот в порядке, кодируемом последовательностью кодонов в молекуле мРНК. Этот процесс продолжается до тех пор, пока в А-участок не попадает один из кодонов (УАГ, УАА или УГА), вызывающих освобождение готового пептида с 70 S-рибосомы. Этот процесс требует участия высвобождающего фактора (фактор R). Затем под действием фактора IF₃ 70 S-рибосома диссоциирует на 30 S- и 50 S-субчастицы.

В клетке трансляция молекулы мРНК начинается до того, как завершается ее синтез; в трансляции участвует одновременно большое число 70 S-рибосом, равномерно распределенных по всей молекуле мРНК. Молекула мРНК вместе с прикрепленными к ней рибосомами называется полисомой. Были получены превосходные электронные микрофотографии, на которых видно, что транскрипция, трансляция и формирование полисом идут одновременно (рис. 7.50).

В настоящее время полностью известен генетический код, представляющий собой правило соответствия между кодонами в мРНК и аминокислотами, которые включаются в белок. Для всех живых организмов код универсален (табл. 7.9). Расшифровка генетического кода, выполненная в результате работы группы исследователей в течение поразительно короткого промежутка времени — примерно за 5 лет, — расценивается как крупнейшее достижение биологии и всей науки.

ТАБЛИЦА 7.9
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Первая буква	Вторая буква			
	У	Ц	А	Г
У	УУУ Фен ¹⁾	УЦУ Сер	УАУ Тир	УГУ Цис
	УУЦ Фен	УЦЦ Сер	УАЦ Тир	УГЦ Цис
	УУА Лей	УЦА Сер	УАА (нет) ²⁾	УГА (нет) ²⁾
	УУГ Лей	УЦГ Сер	УАГ (нет) ²⁾	УГГ Три
Ц	ЦУУ Лей	ЦЦУ Про	ЦАУ Гис	ЦГУ Арг
	ЦУЦ Лей	ЦЦЦ Про	ЦАЦ Гис	ЦГЦ Грг
	ЦУА Лей	ЦЦА Про	ЦАА Глн	ЦГА Арг
	ЦУГ Лей	ЦЦГ Про	ЦАГ Глн	ЦГГ Арг
А	АУУ Иле	АЦУ Тре	ААУ Асн	АГУ Сер
	АУЦ Иле	АЦЦ Тре	ААЦ Асн	АГЦ Сер
	АУА Иле	АЦА Тре	ААА Лиз	АГА Арг
	АУГ Мет	АЦГ Тре	ААГ Лиз	ААГ Арг
Г	ГУУ Вал	ГЦУ Ала	ГАУ Асп	ГГУ Гли
	ГУЦ Вал	ГЦЦ Ала	ГАЦ Асп	ГГЦ Гли
	ГУА Вал	ГЦА Ала	ГАА Глу	ГГА Гли
	ГУГ Вал	ГЦГ Ала	ГАГ Глу	ГГГ Гли

¹⁾ Используются принятые в русской литературе обозначения аминокислот.

²⁾ Бессмысленные кодоны (см. гл. 13); кодоны УАА и УАГ называют соответственно ochre- и amber-кодонами.

ВТОРИЧНАЯ И ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

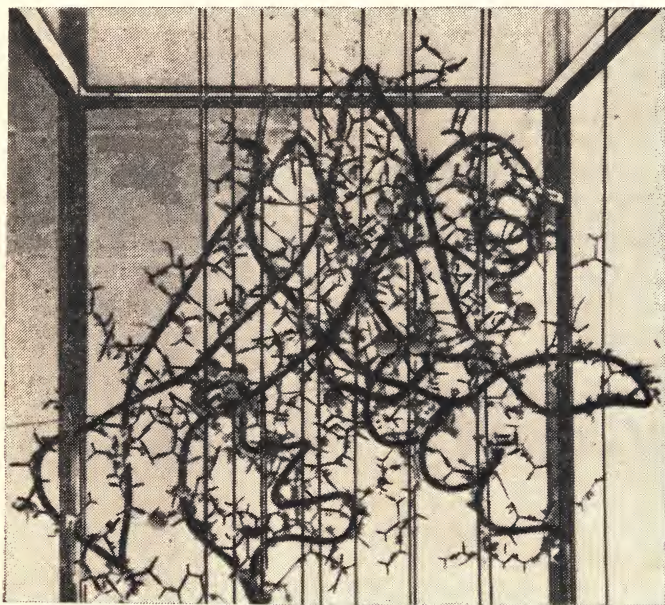
Еще до того, как новообразованная полипептидная цепь отделяется от рибосомы, она начинает складываться в компактную трехмерную структуру. Сначала участки полипептида скручиваются в регулярную спиральную структуру, которая называется α -спиралью: она представляет собой *вторичную структуру* белка. Затем вся молекула, включая участки, имеющие α -спиральную конфигурацию, складывается сама на себя и принимает характерную трехмерную форму, которая называется *третичной структурой* белка.

Вторичная и третичная структура белка определяются только его первичной структурой; полипептид с определенной последовательностью аминокислот может принять только одну, вполне определенную конфигурацию, представляющую собой его наиболее устойчивое состояние. Это можно доказать экспериментально. Если какой-либо белок, например фермент, денатурировать (т. е. заставить развернуться) в особых условиях, то после удаления денатурирующего агента белок снова сложится и перейдет в нативное состояние; при этом его ферментативная активность полностью восстанавливается.

Рис. 7.51. Фотография трехмерной модели белка рибонуклеазы S. Полипептидный остов молекулы обозначен длин-

ной черной трубкой; боковые цепи аминокислот представлены более тонкими ответвлениями. Атомы серы обозначе-

ны крупными шариками; видны четыре дисульфидных мостика. (Фото предоставлено Ф. Ричардсом.)



Доля молекулы, которая находится в α -спиральной конфигурации, варьирует в различных белках от 0 до почти 100%. α -Спираль поддерживается водородными связями между кислородом бывшей карбоксильной группы одной пептидной связи и амидным азотом другой пептидной связи, расположенной через три остатка дальше по цепи. В результате конфигурация цепи представляет собой спираль, которая делает один виток (360°) на каждые 3,6 аминокислотных остатков.

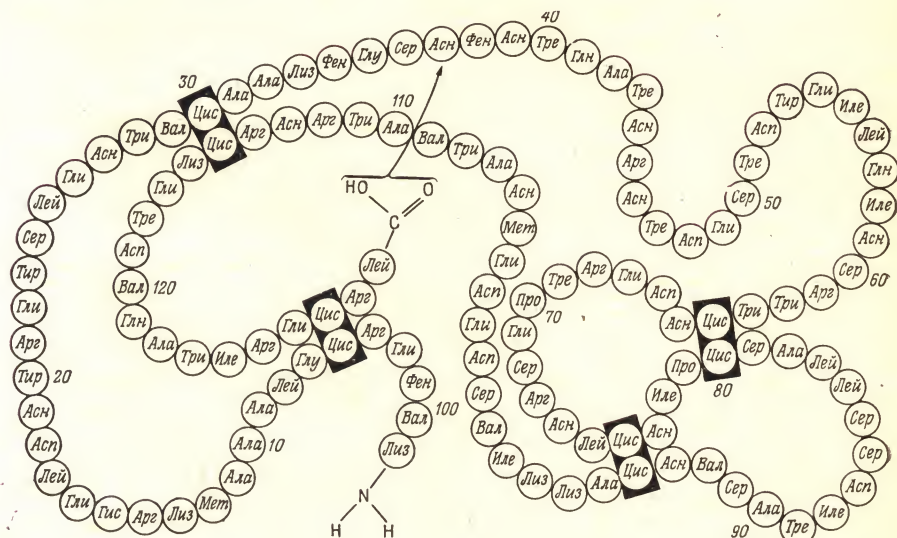
Третичная структура нескольких белков была полностью установлена с помощью дифракции рентгеновских лучей. Первыми такими белками были миоглобин (гемопротейд — переносчик кислорода в мышцах) и гемоглобин (гемопротейд — переносчик кислорода в крови). Полное установление этих структур потребовало многих лет работы. После этого были установлены трехмерные структуры двух ферментов, лизоцима и рибонуклеазы. Модель структуры рибонуклеазы показана на рис. 7.51.

Третичная структура большинства белков поддерживается связями нескольких типов, важнейшие из них — дисульфидные мостики и гидрофобные связи. Например, лизоцим

Рис. 7.52. Первичная структура лизоцима из куриного яйца; показаны четыре дисульфид-

ных мостика между остатками цистеина (Canfield, Liu, The disulfide bonds of egg-white ly-

sozyme (muramidase), J. Biol. Chem., 240, 1997, 1965).



содержит четыре дисульфидных мостика; они отмечены на рис. 7.52. Гидрофобные связи образуются в результате складывания молекулы таким образом, что гидрофобные (неполярные) боковые цепи аминокислот оказываются плотно упакованными во внутренней области трехмерной структуры, а большинство полярных групп выступает наружу. Конфигурация молекулы поддерживается также водородными связями между различными участками пептида, подобными связям α -спирали. К таким связям относятся водородные связи боковых цепей, например между гидроксильной группой тирозина и свободной карбоксильной группой, и ионные связи между свободными карбоксильными и аминогруппами кислых и основных аминокислот соответственно.

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Четвертичная структура белков образуется путем нековалентного связывания нескольких полипептидов, каждый из которых имеет собственную первичную, вторичную и третичную структуру. Например, глутаматдегидрогеназа (ГДГ) состоит из 24 — 30 одинаковых субъединиц, мол. вес каждой из которых составляет $\sim 40\,000$. Эти субъединицы агрегируют в две стадии: вначале они ассоциируют и образуют «мономеры» с

мол. весом 250 000 — 300 000, а затем четыре таких «мономеров» ассоциируют и образуют олигомерную «молекулу» фермента. Каталитической активностью обладают олигомер и «мономер», но не субъединица.

Важнейшее свойство многих олигомерных ферментов — их чувствительность к регуляции эффекторами, небольшими молекулами, которые не имеют сходства с субстратами этих ферментов. Такие ферменты являются аллостерическими белками: помимо каталитического центра, все они обладают одним или несколькими центрами связывания специфических эффекторов. Связывание эффектора с аллостерическим ферментом изменяет родство последнего к субстрату, так что его каталитическое действие стимулируется или ингибируется. Этот вопрос будет подробно обсуждаться в гл. 8.

СИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Свойства некоторых систем синтеза полисахаридов описаны в табл. 7.10. Характерной особенностью синтеза полисахаридов, как и в случае синтеза ДНК, является необходимость

ТАБЛИЦА 7.10
СИСТЕМЫ СИНТЕЗА ПОЛИСАХАРИДОВ

Полисахарид	Повторяющаяся единица	Предшественник
Гликоген	α -D-глюкоза (1 \rightarrow 4)	УДФ-глюкоза (у животных) АДФ-глюкоза (у бактерий)
Целлюлоза	β -D-глюкоза (1 \rightarrow 4)	ГДФ-глюкоза
Ксилан	β -D-ксилоза (1 \rightarrow 4)	УДФ-ксилоза
Капсульный полисахарид пневмококка типа III	β -D-глюкуроновая кислота (1 \rightarrow 4) β -D-глюкоза (1 \rightarrow 3)	УДФ-глюкуроновая кислота УДФ-глюкоза

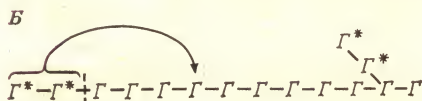
затравки. В случае синтеза полисахаридов это короткий сегмент того же полисахарида, который будет синтезироваться; он служит акцептором новых мономерных фрагментов. Функция затравки была подробно изучена в случае синтеза гликогена; оказалось, что для того, чтобы затравка эффективно функционировала, она должна содержать более четырех сахарных остатков (рис. 7.53). Ветвление молекулы, характерное для гликогена, осуществляет особый фермент, который отщепляет мелкие фрагменты с конца линейной полисахаридной цепи, связанной 1,4-связями, и присоединяет их в другом месте 1,6-связью.

буквой Г обозначены остатки глюкозы. А. Перенос остатка глюкозы с АДФГ на молекулу

А

$AD\Phi\Gamma^* + \Gamma \rightarrow \Gamma^* + AD\Phi$

Затравка



Синтез компонентов клеточной стенки занимает особое место среди биополимеров, так как полимеризация происходит снаружи от клеточной мембраны, где нет АТФ (единственного источника энергии для образования любых активированных мономеров). Наглядным примером того, как полимеры способны синтезироваться снаружи от мембраны, служит биосинтез пептидогликанового слоя стенки.

Повторяющиеся элементы пептидогликана синтезируются в цитоплазме, будучи связанными с нуклеотидом УДФ. Затем они соединяются с липидным переносчиком, который облегчает их прохождение через мембрану. Наконец, полимеризация в пептидогликан происходит снаружи от мембраны под действием ферментов, расположенных на ее внешней поверхности.

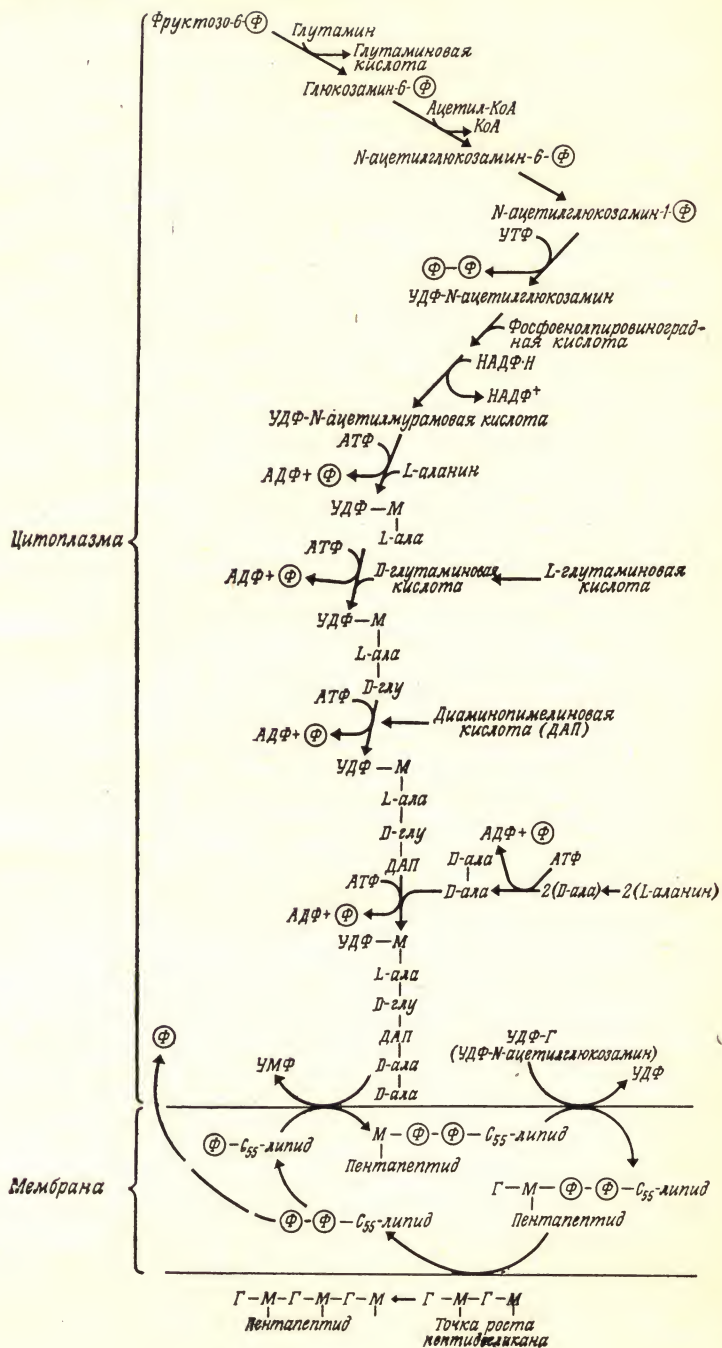
313 Этапы биосинтеза пептидогликана у *E. coli* и места клетки, где они протекают, приведены на рис. 7.55. N-ацетилму-

$$\begin{array}{c}
 \text{N-ацетилглюкозамин} \\
 \text{N-ацетилмуравьинья кислота} \\
 \text{CH}_2\text{OH} \\
 \text{O} \\
 \text{H} \quad \text{H} \\
 \text{HO} \quad \text{OH} \quad \text{H} \\
 \text{H} \quad \text{NH} \\
 \text{C=O} \\
 \text{CH}_3
 \end{array}
 \xrightarrow{\beta-1,4}
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_2\text{OH} \\
 \text{O} \\
 \text{H} \quad \text{H} \\
 \text{H} \quad \text{H} \\
 \text{O} \quad \text{NH} \\
 \text{HC-CH}_3 \quad \text{C=O} \\
 \text{CO} \quad \text{CH}_3
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{L-аланин} \\
 \left\{ \begin{array}{l} \text{NH} \\ \text{HC-CH}_3 \\ \text{C=O} \end{array} \right. \\
 \text{D-глутаминовая кислота} \\
 \left\{ \begin{array}{l} \text{CH} \\ \text{HC-(CH}_2\text{)}_2\text{-COOH} \\ \text{C=O} \end{array} \right. \\
 \text{мезо-Диаминопимелиновая кислота} \\
 \left\{ \begin{array}{l} \text{NH} \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \text{HC-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH-COOH} \\ \text{C=O} \end{array} \right. \\
 \text{D-аланин} \\
 \left\{ \begin{array}{l} \text{NH} \\ \text{HC-CH}_3 \\ \text{COOH} \end{array} \right.
 \end{array}$$

Рис. 7.54. А. Схематическое изображение организации интактного пептидогликанового мешка у *E. coli*; Г и М — остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты соответственно. Линии, отходящие от М — тетрапептиды, прикрепленные к остаткам муравовой кислоты. Б. Повторяющиеся субъединицы полимеризуются в одном направлении с помощью β -1,4-гликозидных связей, а в другом — с помощью пептидных связей между карбоксильной группой D-аланинового остатка одного тетрапептида и ϵ -аминогруппой другого тетрапептида, однако не все пары тетрапептидов соединены подобным образом (Ghuysen J., *Bacteriolytic enzymes in the determination of wall structure*, *Bacteriol. Rev.*, 32, 425, 1968).

Рис. 7.55. Путь синтеза пептидогликана у *E. coli*.



рамовая кислота синтезируется постепенно в цитоплазме, оставаясь прикрепленной к УДФ. Затем она переносится на C_{55} -полиизопреновый липид (бактопренол), функционирующий как переносчик в мембране. Здесь к ней присоединяется остаток N-ацетилглюкозамина, завершая образование мономерной единицы пептидогликана. Единица, прикрепленная к липиду с длинной цепью, может пройти через мембрану, выйти на ее наружную поверхность и присоединиться 1,4-гликозидной связью к точке роста пептидогликанового мешка. Наконец, если новая мономерная единица должна участвовать в поперечном связывании между пептидными остатками, фермент, расположенный в наружной части мембраны, катализирует реакцию транспептидации; при этом расщепляется пептидная связь между двумя концевыми D-аланиновыми остатками и образуется пептидная связь между предпоследним остатком D-аланина и свободной аминогруппой диаминопимелиновой кислоты соседней пептидной цепи. Если пептид новой мономерной единицы не должен участвовать в поперечном связывании, тот же фермент удаляет концевую группу D-аланина и новая пептидная связь не образуется.

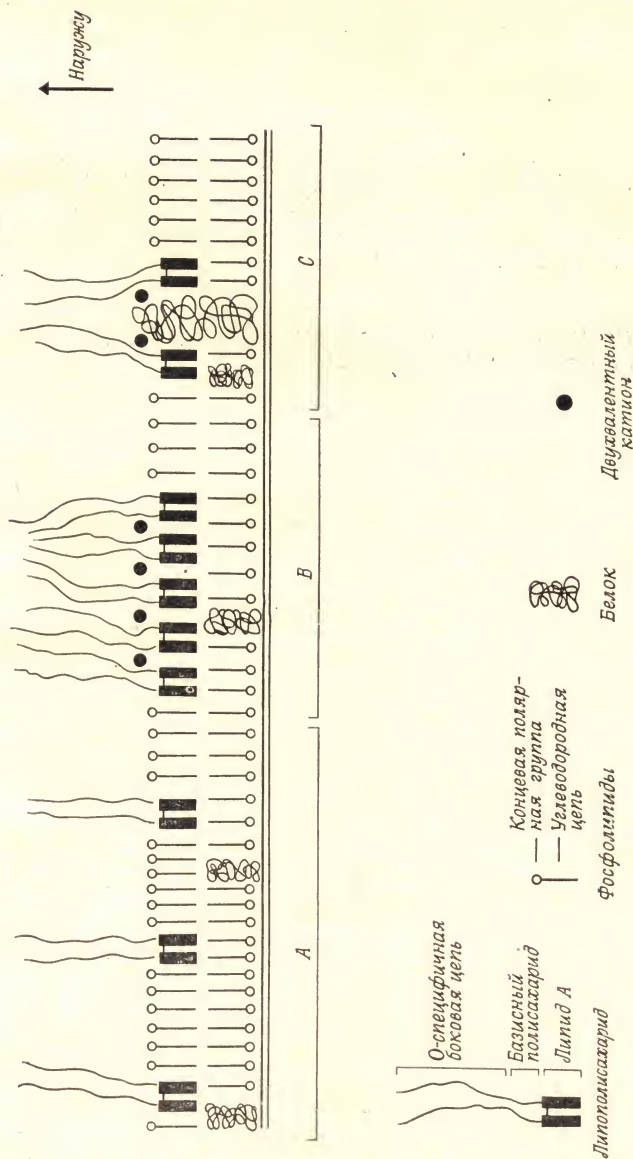
Поскольку слой пептидогликана обеспечивает структурную жесткость, сдерживающую внутреннее осмотическое давление, которое обычно имеется у бактерий почти в любой среде, этот слой, пока клетка растет, должен оставаться интактным. Слой пептидогликана можно уподобить сити. Повреждение сита в одном месте не снижает в заметной степени его общую прочность. Во время роста пептидогликановый мешок под действием строго регулируемых ферментов автолиза в отдельных точках разрывается, и благодаря этому он способен увеличиваться путем вставки новых мономерных единиц.

ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ

Внешний слой стенки грамотрицательных бактерий на электронных микрофотографиях тонких срезов похож на клеточную мембрану. Однако по химической структуре они совершенно различны (рис. 7.56). Стенка содержит сложное липидное вещество — липид А, который состоит из остатков глюкозамина с заместителями — жирными кислотами с длинной цепью и фосфатом (рис. 7.56). Липид А прикреплен к сложному углеводу (базисный полисахарид), который состоит из различных сахаров, в том числе 2-кето-3-дезоксикетоновой кислоты (КДО); последняя встречается только в липополисахаридном слое. Наконец, на внешней поверхности слоя расположены полисахаридные нити, выступающие в среду; это так называемые *O-специфические цепи*, сообщающие штаммоспецифические антигенные свойства некоторым грамотрицательным бактериям.

316 К настоящему времени путь синтеза O-специфической цепи изучен довольно подробно. Он несколько напоминает синтез

Рис. 7.56. Возможная укладка основных компонентов наружного слоя стенки грамотрицательных клеток (Nikaido, Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide, in Bacterial Membranes and Walls, L. Leive (ed.), New York: Marcel Dekker, 1973).



пептидогликана, так как в данном случае во время синтеза цепь также прикрепляется к C_{55} -изопреновому липиду. Однако отличие состоит в том, что О-специфичная цепь прикреплена к C_{55} -липиду на протяжении всего синтеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Книги

- Kornberg A.*, 1974, DNA Synthesis, San Francisco, W. H. Freeman. (Корнберг А., Синтез ДНК, изд-во «Мир», 1977.)
Lehninger A. L., 1970, Biochemistry, New York, Worth Publishers.
Mandelstam J., McQuillen K. (eds.), 1973, Biochemistry of Bacterial Growth, 2nd ed., New York, Wiley.

Обзоры

- Dalton H., Mortenson L. E.* (1972), Dinitrogen (N_2) Fixation (with a Biochemical Emphasis), Bact. Revs., 36, 231.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие к четвертому изданию	7
1 Первые шаги микробиологии (Перевод Ю. Н. Зографа)	9
Открытие мира микробов	9
Спор о самозарождении организмов	12
Открытие роли микроорганизмов в превращении органических веществ	17
Открытие роли микроорганизмов как возбудителей болезней	20
Разработка метода чистых культур	25
Микроорганизмы как геохимические агенты	30
Развитие микробиологии в двадцатом веке	32
Список литературы	34
2 Методы микробиологии (Перевод Ю. Н. Зографа)	35
Методы получения чистых культур	35
Теория и практика стерилизации	42
Принципы питания микробов	46
Подбор состава культуральных сред	57
Селективные среды	66
Световая микроскопия	75
Список литературы	86
3 Природа микроорганизмов (Перевод А. М. Колчинского)	87
Общие свойства биологических систем	87
Организация и функционирование эукариотической клетки	95
Организация и функционирование прокариотической клетки	110
Заключительные замечания о прокариотах и эукариотах	121
Список литературы	123
4 Протисты (Перевод В. К. Плакунова)	125
Водоросли	125
Простейшие (Protozoa)	139
Грибы	146
Слизевики	160
Заклучение	163
Список литературы	164
5 Прокариоты: вводный обзор (Перевод В. К. Плакунова)	165
Основные таксономические подразделения прокариот	168
Микоплазмы	173
Грамположительные бактерии	175
Грамотрицательные бактерии	181
Основные группы грамотрицательных бактерий	187
Заклучение	207
319 Список литературы	208

6	Метаболизм микроорганизмов: образование АТФ (Перевод А. М. Колчинского)	209
	Некоторые термодинамические закономерности	209
	Роль АТФ в биосинтезе	210
	Роль пиридиновых нуклеотидов в метаболизме	213
	Пути метаболизма, приводящие к образованию АТФ	215
	Биохимия образования АТФ у гетеротрофов	219
	Биохимия брожения	226
	Специфические начальные реакции метаболизма органических соединений у микроорганизмов	228
	Окисление неорганических соединений	229
	Фотосинтез	230
	Механизм переноса электронов	238
	Список литературы	248

7	Обмен веществ у микроорганизмов: биосинтез (Перевод А. М. Колчинского)	249
	Методы исследования биосинтеза	249
	Ассимиляция неорганического углерода, азота и серы	253
	Стратегия биосинтеза	263
	Синтез нуклеотидов	264
	Синтез аминокислот и других азотсодержащих компонентов клетки	271
	Синтез липидных компонентов из уксусной кислоты	282
	Синтез порфиринов	289
	Взаимосвязь путей катаболизма и биосинтеза	293
	Биосинтез макромолекул: общие принципы	295
	Синтез ДНК	298
	Синтез РНК	303
	Синтез белков	305
	Синтез полисахаридов	312
	Синтез компонентов клеточной стенки	313
	Список литературы	318

Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм

МИР МИКРОБОВ

том I

Научные редакторы Ю. И. Лашкевич, Т. И. Жилиева

Мл. научный редактор Р. Ф. Куликова

Художник Л. А. Кулагин

Художественный редактор Б. Н. Юдкин

Технический редактор Л. П. Чуркина

Корректор Е. Г. Литвак

ИБ № 1853

Сдано в набор 02.01.79.

Подписано к печати 13.04.79.

Формат 60×90¹/₁₆

Бумага типографская № 2.

Гарнитура латинская. Печать высокая.

Объем 10 бум. л. 20 печ. л. Уч.-изд. л. 19,91. Изд. № 4/9846.

Тираж 12 000 экз. Зак. 1197. Цена 1 р. 60 к.

Издательство «Мир»

Москва, 1-й Рижский пер., д. 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете Совета Министров СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
113105. Москва, Нагатинская ул., 1.

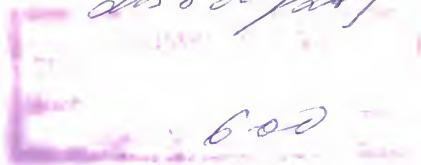
09
09
10
13
15
19
26

28
29
30
38
48

49
49
53
63
64
71
82
89
93
95
98
03
05
12
13
18



205830/204



600

Em



MAN

MAK

BOB

